

Aus dem Institut für Hygiene der Bundesanstalt für MilCHForschung in Kiel
(Direktor: Professor Dr. A. Tolle)

ZUR BEURTEILUNG DER BAKTERIOLOGISCH - HYGIENISCHEN WERTIGKEIT
VON MILCH DURCH DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PYRUVAT UND
DIE COMPUTER-BILD-ANALYSE VON PLATTENKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Helmut Wernery

Tierarzt aus Leck/Nordfriesland



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene der Bundesanstalt für MilCHForschung in Kiel
(Direktor: Professor Dr. A. Tolle)

ZUR BEURTEILUNG DER BAKTERIOLOGISCH - HYGIENISCHEN WERTIGKEIT
VON MILCH DURCH DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PYRUVAT UND
DIE COMPUTER-BILD-ANALYSE VON PLATTENKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Helmut Wernery
Tierarzt aus Leck/Nordfriesland

Berlin 1972
Journal-Nr. 771

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin



Vorsitzender:	Prof. Dr. J. Boch
Referent:	Prof. Dr. H. -J. Sinell
Korreferent:	Prof. Dr. F. Untermann

Tag der Promotion: 14. Februar 1972

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG
2. SCHRIFTTUM
 - 2.1. Zur bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit von Milch
 - 2.1.1. Bakterielle Kontamination von Rohmilch
 - 2.1.2. Keimvermehrung in Rohmilch in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur
 - 2.1.2.1. Glykolyse in unzureichend gekühlter Milch
 - 2.1.2.2. Proteo- und Lipolyse unter psychrotrophen Wachstumsbedingungen
 - 2.1.2.3. Messung glykolytischer Substratveränderungen als Grundlage der derzeitigen Qualitätsbeurteilung
 - 2.1.2.3.1. Redoxpotential
 - 2.1.2.3.2. Azidität und Eiweißstabilität
 - 2.1.2.4. Möglichkeiten zur Messung proteo- und lipolytischer Substratveränderungen
 - 2.1.2.5. Keimzählung unter psychrotrophen Wachstumsbedingungen
 - 2.1.3. Pasteurisierungseffekt
 - 2.1.4. Rekontamination pasteurisierter Milch
 - 2.1.5. Keimvermehrung in pasteurisierter Milch
 - 2.1.5.1. Messung des Keimgehaltes
 - 2.1.5.1.1. Colititer
 - 2.1.5.1.2. Gesamtkeimzahlbestimmung im Plattenverfahren
 - 2.2. Stellung von Pyruvat im Stoffwechselgeschehen
 - 2.3. Automatisierung der Keimzählung von Plattenkulturen
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN
 - 3.1. Material
 - 3.1.1. Proben für die sequentielle Pyruvatbestimmung nach experimenteller Kontamination steriler Rohmilch mit Reinkulturen
 - 3.1.2. Proben für die sequentielle Pyruvatbestimmung in roher Sammelmilch und pasteurisierter Trinkmilch
 - 3.1.3. Einmalige Stichproben für Pyruvatbestimmungen in Viertelgemelken und roher Sammelmilch
 - 3.1.4. Proben roher Sammelmilch für Pasteurisierungsversuche

- 3.1.5. Einmalige Stichproben aus roher Sammelmilch und pasteurisierter Trinkmilch für die kulturell-bakteriologische Untersuchung mit Hilfe der Computer-Bild-Analyse
- 3.2. Methodik
 - 3.2.1. Messung von Stoffwechselfparametern des bakteriellen Katabolismus in der kontinuierlichen Durchflußanalyse
 - 3.2.1.1. Pyruvat
 - 3.2.1.2. Milchsäure
 - 3.2.1.3. Ammoniak
 - 3.2.1.4. Freie Fettsäuren
 - 3.2.2. Kulturell-bakteriologische Untersuchung mit Hilfe der Computer-Bild-Analyse
 - 3.2.2.1. Präparation der Kulturplatten
 - 3.2.2.2. Prinzip der Arbeitsweise des Quantimet 720
 - 3.2.2.3. Bedienung der Zähleinrichtung
 - 3.2.2.4. Eichung und Einstellung des Gerätes zur Plattenzählung
 - 3.2.2.5. Durchführung der Plattenzählung zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl
 - 3.2.2.6. Selektive Erfassung bestimmter Keimgruppen
 - 3.2.3. Konventionelle Milchuntersuchungsmethoden
 - 3.2.3.1. Messung des Redoxpotentials
 - 3.2.3.2. Messung der Eiweißstabilität mit Hilfe von Alkohol
 - 3.2.3.3. Messung des pH-Wertes
 - 3.2.3.4. Sensorische Prüfung
 - 3.2.4. Bestimmung der Anzahl somatischer Zellen in der kontinuierlichen Durchflußanalyse
 - 3.2.5. Erfassung und Verarbeitung der Daten
- 3.3. Untersuchungsergebnisse
 - 3.3.1. Pyruvat als zentraler Parameter des bakteriellen Katabolismus
 - 3.3.1.1. Spezifität der fluorometrischen Pyruvatbestimmung
 - 3.3.1.2. Konservierung des Pyruvat-Pools in Milchproben
 - 3.3.1.3. Der Pegel des Pyruvat-Pools in Beziehung zu sekretorischen Faktoren
 - 3.3.1.3.1. Pyruvat-Gehalt in steril gewonnener Milch gesunder Versuchstiere
 - 3.3.1.3.2. Pyruvat-Gehalt in Viertelgemelksproben aus einem Praxisbezirk in Beziehung zu laktationsphysiologischen und -pathologischen Faktoren
 - 3.3.1.3.2.1. Viertelposition
 - 3.3.1.3.2.2. Laktationsnummer
 - 3.3.1.3.2.3. Laktationsstadium
 - 3.3.1.3.2.4. Anzahl somatischer Zellen
 - 3.3.1.3.2.5. Bakteriologische Befunde aus der Mastitisdiagnostik
 - 3.3.1.4. Der Pegel des Pyruvat-Pools in Beziehung zu postsekretorischen Faktoren im Rohmilchbereich

- 3.3.1.4.1. Turbulente Luftdurchströmung in Rohranlagen
- 3.3.1.4.2. Keimzahl in Sammelmilch
- 3.3.1.4.3. Zellgehalt in Sammelmilch
- 3.3.1.4.4. Keimzahl nach experimenteller Kontamination steriler Rohmilch mit Reinkulturen im Verlauf einer Zeitreihe
- 3.3.1.4.5. Metaboliten der Glyko-, Proteo- und Lipolyse
- 3.3.1.4.6. Reduktionsvermögen, Eiweißstabilität, Sensorik
- 3.3.1.5. Der Pegel des Pyruvat-Pools in Beziehung zu postsekretorischen Faktoren im Trinkmilchbereich
- 3.3.1.5.1. Pasteurisierung
- 3.3.1.5.2. Keimzahl in pasteurisierter Trinkmilch
- 3.3.1.5.3. Metaboliten der Glyko-, Proteo- und Lipolyse
- 3.3.1.5.4. Reduktionsvermögen, Eiweißstabilität, Sensorik
- 3.3.2. Teilautomatisierung der Plattenzählung mit Hilfe der Computer-Bild-Analyse
- 3.3.2.1. Beziehung zur visuellen Zählung
- 3.3.2.1.1. Bestimmung der Gesamtkeimzahl
- 3.3.2.1.2. Selektive Zählung bestimmter Keimgruppen
- 3.3.2.2. Wiederholbarkeit
- 3.3.2.3. Leistungsfähigkeit

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATUR

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Bedeutung pathogener Mikroorganismen in der Milch, die von allgemeinen Infektionen des Milchtieres und von postsekretorischen Kontaminationen durch verunreinigte Gegenstände oder durch den Menschen herrühren, ist seit langem bekannt. Durch die staatliche Seuchenbekämpfung bei Tier und Mensch, die amtlich vorgeschriebene Pasteurisierung und die Aufrechterhaltung der Kühlkette bis zum Konsum wird der Schutz des Verbrauchers vor pathogenen Mikroorganismen sichergestellt. So konnten in einer kürzlich abgeschlossenen Enquete über den bakteriologischen, biochemischen und rückstandsanalytischen Status der Trinkmilch in 14 Versorgungsgebieten der BRD Salmonellen, *Listeria monocytogenes* und obligat pathogene Streptokokkenarten in keiner, *Staphylococcus aureus* lediglich in einer der untersuchten 1 920 Milchproben nachgewiesen werden (1). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der von mehreren Autoren getroffenen Feststellung, daß die Trinkmilch im Vergleich zu anderen Nahrungsmitteln an Lebensmittelvergiftungen relativ selten beteiligt ist (2, 3, 4). In jedem Falle stehen für den Rahmen, in dem Milchproben auf pathogene Mikroorganismen untersucht werden, leistungsfähige Nachweisverfahren zur Verfügung.

Dagegen bereitet die regelmäßige quantitative Erfassung von Populationen saprophytärer Mikroorganismen oder analoger Stoffwechselgrößen unter den gegenwärtigen Bedingungen der milchwirtschaftlichen Praxis große Schwierigkeiten; Solange die Milch nicht gekühlt wurde und unter diesen Inkubationsbedingungen eine vorwiegend durch Glykolyse gekennzeichnete Keimflora dominierte, war die einfache Bestimmung des Redoxpotentials über Farbstoffreduktionsproben ein hinreichend sicherer Parameter für die bakteriologische Beschaffenheit der Rohmilch. Mit der zunehmenden Industrialisierung der Be- und Verarbeitung der Milch sind jedoch die Entfernungen vom Erzeugerbetrieb zur Molkerei zeitlich und räumlich immer größer geworden, so daß eine Tiefkühlung des hochempfindlichen

Substrates Milch im Erzeugerbetrieb unumgänglich geworden ist. Diese psychrotrophen Bedingungen sind mit einer Änderung der Keimflora und deren biochemischer Aktivität verbunden, die nicht mehr durch die Dominanz der Glykolyse, sondern vielmehr durch proteo- und lipolytische Veränderungen gekennzeichnet ist. Reduktionsproben liefern unter diesen Umständen kaum noch eine genügende Information über den bakteriologischen Status der Milch.

Als geeigneter Parameter hierfür sind Kulturverfahren unter psychrotrophen Inkubationsbedingungen anzusehen, wie sie in Form der elektronischen Mikrokolonie-zählung einen relativ hohen Grad an Präzision und Leistungsfähigkeit erreicht haben. Allerdings sind - wie für jedes Kulturverfahren - die Anforderungen an die Probenahme so anspruchsvoll, daß der breiten Durchführung in der Praxis größere Schwierigkeiten entgegenstehen. Gelöste Substanzen dagegen lassen eine Erleichterung der repräsentativen Probenahme und auch der Konservierung erwarten. Zumindest für den Rohmilchbereich ist deshalb ein in gelöster Form vorliegender zentraler Metabolit, der die mikrobiologische Belastung des Substrates hinreichend sicher anzeigt, von großem milchhygienischem Interesse. Wünschenswert ist ein Parameter, der die mikrobiologische Anamnese aus dem Rohmilchbereich auch noch im Trinkmilchbereich erkennen läßt.

Die Trinkmilch wird seit Jahrzehnten über die Bestimmung der gesamten oder selektiv erfaßbaren Keimflora mit Hilfe von Gußplattenverfahren beurteilt. Die hiermit verbundenen Zählarbeiten belasten in starkem Maße die menschliche Arbeitskraft, sind schwer kontrollierbar und mit zahlreichen Fehlermöglichkeiten behaftet. Eine Automatisierung zumindest des Zählvorganges würde im Rahmen von Reihenuntersuchungen Zeit, Personal und Kosten sparen und sollte mit einer Verbesserung der Präzision und Zuverlässigkeit der Meßdaten sowie einer Beschleunigung des Informationsflusses verbunden sein.

In Fortführung der experimentellen Arbeiten des Instituts für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel über die Messung und Beurteilung des bakteriellen Katabolismus in Milch wurde mir von Professor Dr. A. Tolle die Aufgabe gestellt,

1. die Eignung der Brenztraubensäure als zentralem Stoffwechselfparameter zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit der Milch
 - und 2. die Möglichkeit einer Automatisierung von Keimzählungen durch den Einsatz der Computer-Bild-Analyse
- zu prüfen.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Zur bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit von Milch

2.1.1. Bakterielle Kontamination von Rohmilch

Unter Umgehung der natürlichen Drüsenöffnung durch aseptisch durchgeführte Punktionen der Drüsenzisterne gewonnene Milch ist steril (5). Eine unvermeidliche Kontamination der Milch gesunder Tiere (100 - 1 000 Keime/ml) erfolgt jedoch regelmäßig bei der Passage des Ductus papillaris (6). Bei den hieran beteiligten Keimen handelt es sich vorwiegend um Mikrokokken, Staphylokokken, Corynebakterien und Streptokokken (7, 8, 9).

Die Bedeutung einer Kontamination durch Luftkeime liegt weniger in ihrer Anzahl ($< 50/\text{ml}$) als vielmehr darin, als Sporenbildner (*Bac. subtilis*, *Bac. circulans*, *Bac. licheniformis* und *Bac. pumilus*) die Pasteurisierung zu überleben (6). Die beim konventionellen Melken unvermeidbare mikrobielle Kontamination der Milch durch die Passage des Strichkanals, durch Melkverunreinigungen, durch Kontakt mit der Luft und ordnungsgemäß behandelte Oberflächen der Melkeinrichtung liegt in der Größenordnung von 1 000 - 10 000 Keimen/ml (10.) .

Bei weitem die stärkste Kontamination erfolgt durch unsachgemäßes Melken und insbesondere durch Berührung der Milch mit ungenügend gereinigten und desinfizierten Oberflächen von Melkanlagen, Aufbewahrungs- und Transportbehältern (bis zu 500 000 Keime/ml). Darüber hinaus ist der mikrobiellen Beschaffenheit des Spülwassers besondere Bedeutung beizumessen (11). Die beteiligten Keimarten repräsentieren ein breites Spektrum der mikrobiellen Systematik: Mikrokokken, Streptokokken, coliforme Bakterien, Laktobazillen, Corynebakterien, Staphylokokken, aerobe Sporenbildner, Pseudomonaden, Flavobakterien und andere.

In Ablagerungen von Melkmaschinen wurden sehr unterschiedliche Keimzahlen zwischen $1\,240 \times 10^6$ und $200\,000 \times 10^6$ pro Gramm gefunden. Die quantitative Beteiligung der verschiedenen Keimgruppen weist erhebliche Schwankungen auf (12).

Die zahlreichen die Milch kontaminierenden Keimarten unterscheiden sich erheblich in ihren biologischen Eigenschaften und ihrer biochemischen Aktivität. Das Dominieren bestimmter Keimgruppen läßt gewisse Rückschlüsse auf die Kontaminationsquelle oder einen Einfluß selektiv wirkender Reinigungs- und Desinfektionsmittel zu.

2.1.2. Keimvermehrung in Rohmilch in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur

Nach der Adaptation an das Nährsubstrat Milch ist die Keimvermehrung eine Funktion von Temperatur, Zeit und beteiligten Keimarten. Unter definierten Verhältnissen ist die Wachstumskurve für jede Keimart charakteristisch. Unterschiedliche, durch Species, Anpassung an das Nährsubstrat und Wachstumsverhältnisse bedingte Generationszeiten führen unter Berücksichtigung der exponentiellen Vermehrung zur Entwicklung einer dominierenden Flora.

2.1.2.1. Glykolyse in unzureichend gekühlter Milch

Bei unzureichender Kühlung wird die Keimzahl der Anlieferungsmilch in Abhängigkeit vom Anlieferungsintervall nicht allein durch die Primärkontamination, sondern meist in weit stärkerem Maße durch die Vermehrung der Mikroorganismen bestimmt. Milchsäurebakterien (Laktobazillen und Streptokokken, insbesondere *Sc. lactis*) haben in unzureichend gekühlter Milch die höchste Vermehrungsrate und unterdrücken mit zunehmender Säurebildung das Wachstum der sich anfangs auch üppig vermehrenden gram-negativen, proteo- und lipolysierenden Keimflora. Von einem bestimmten Säuregrad an gilt Rohmilch als verdorben und für die weitere molkereitechnische Be- und Verarbeitung als nicht mehr geeignet.

Bei unzureichender Kühlung von Rohmilch gibt die Quantifizierung der Milchsäure vorwiegend das Ausmaß der Glykolyse wieder, die auf verschiedenen Wegen abläuft und am Beispiel der Glukose als wichtigstem Baustein der Kohlenhydrate aufgezeigt werden soll.

Die charakteristischen Reaktionsfolgen des Glukoseabbaus sind:

1. Einleitende Spaltung zu C_3 -Verbindungen
2. Zitronensäurezyklus
3. Atmungskette

Für die einleitende Spaltung zu C_3 -Verbindungen können drei Wege beschritten werden:

Der FDP (Fructose-1, 6-diphosphat)-Weg, bei dem als Abbauprodukt Brenztraubensäure (Pyruvat) entsteht.

Der PP (Pentose-Phosphat)-Weg, bei welchem Pentose-Phosphate (Ribulose-5-phosphat) entwickelt werden, die in Hexose- und Triose-Phosphate umgewandelt werden. Die Hexosen können wieder in die direkte Glukoseoxydation eingehen, die Triosen werden entweder über den FDP-Weg abgebaut oder zwei Moleküle Triose kondensieren zu einem Molekül Hexose.

Der KDPG (2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconsäure)-Weg, bei dem als Endprodukt ebenfalls die Brenztraubensäure erscheint.

Das Pyruvat wird durch die Laktat-Dehydrogenase zu Milchsäure reduziert oder über die aktivierte Essigsäure in den Zitronensäure-zyklus eingeschleust. Dieser hat nicht nur die Funktion der terminalen Oxydation der Nahrungsstoffe, sondern stellt für die Biosynthese auch zahlreiche Vorstufen zur Verfügung.

Für die meisten anaerob lebenden Organismen erschöpft sich die Möglichkeit zur Energiegewinnung in Substratketten-Phosphorylierungen. Die weiteren Abbauschritte dienen der Bereitstellung von Biosynthese-Vorstufen.

Zu einer außerordentlich wirksamen Erzeugung von ATP sind die atmenden Organismen befähigt. Sie verfügen über einen besonderen Apparat, die Atmungskette, in der von NADH angelieferter Wasserstoff über mehrere Stufen mit Sauerstoff oder anderen H-Akzeptoren zur Reaktion gebracht wird (13).

2.1.2.2. Proteo- und Lipolyse unter psychrotrophen Wachstumsbedingungen

Unter psychrotrophen Wachstumsbedingungen in Rohmilch vermehrt sich vor allem eine gram-negative Keimflora, die in ihrem Stoffwechsel weniger durch Milchsäurebildung aus Laktose als vielmehr durch Proteolyse und Lipolyse gekennzeichnet ist. Die hierdurch ausgelöste Beeinträchtigung der Rohmilch ist ein komplizierter Vorgang mit zahlreichen synergistischen und antagonistischen Wechselbeziehungen und kann über Einflüsse auf Geruch, Geschmack und Stabilität bis zum Verderben der Rohmilch führen.

Die wichtigsten Vertreter dieser Keimflora sind Pseudomonaden, Flavobakterien, Achromobacter-Arten und auch Enterobakterien.

Die Proteolyse beginnt außerhalb der Zellen durch Zerlegung der Proteine in permeable Spaltstücke mit Hilfe von Enzymen (Proteinasen). Proteolytische Enzyme hydrolysieren die Peptidbindungen im Proteinmolekül. Die aus Polypeptiden und Oligopeptiden bestehenden Bruchstücke können bereits von Zellen aufgenommen und durch intrazelluläre Peptidasen bis zu den Aminosäuren abgebaut werden. Letztere dienen der Zelle entweder zur Proteinsynthese oder werden auf speziellen Stoffwechselwegen desaminiert und in den intermediären Stoffwechsel eingeschleust.

Die Aminosäuren angreifenden Abbaureaktionen können entweder eine Decarboxylierung oder eine Desaminierung sein. Bei der Decarboxylierung entstehen Kohlendioxid und primäre oder biogene Amine, bei der Desaminierung Ammoniak.

Das weitere Schicksal des Kohlenstoffskeletts der Aminosäuren ist bei den einzelnen Aminosäuren unterschiedlich. Einige Desaminierungsprodukte sind zugleich Bestandteile zentraler Abbauwege (Brenztraubensäure, Oxalessigsäure). Andere Kohlenstoffskelette werden über spezielle Abbauwege in die Bahnen des intermediären Stoffwechsels eingeschleust. Letzten Endes mündet auch der Stoffwechsel der Aminosäuren in den Zitronensäurezyklus ein (13).

Bei der Lipolyse entstehen aus Neutralfetten unter Einwirkung von Lipasen Glycerin und freie Fettsäuren. Der weitere Abbau des Glycerins entspricht dem der Kohlenhydrate, wobei als Endprodukte Pyruvat bzw.

aktivierte Essigsäure entstehen. Es kann aber auch zum Aufbau von Fruktose und Glukose verwendet werden. Die freien Fettsäuren werden nach dem Prinzip der Beta-Oxydation in C_2 -Einheiten (aktivierte Essigsäure) zerlegt, die entweder zu Biosynthesen herangezogen werden oder über den Zitronensäurezyklus und die Atmungskette zu CO_2 und H_2O oxydiert werden (13).

Der Fettabbau in Rohmilch wird aber nicht nur durch bakterielle Aktivität hervorgerufen, sondern auch durch turbulente Strömungen in Rohranlagen, z. B. während des Milchentzuges oder der molkereitechnischen Bearbeitung der Milch (14).

2.1.2.3. Messung glykolytischer Substratveränderungen als Grundlage der derzeitigen Qualitätsbeurteilung

In der Bundesrepublik Deutschland werden glykolytische Substratveränderungen als Grundlage der derzeitigen Qualitätsbeurteilung mit Hilfe verschiedener Untersuchungsmethoden zu ermitteln versucht. Nach Abbildung 1 dienen dazu in den einzelnen Bundesländern meist die Methylenblau- oder Resazurin-Reduktionsprobe und die Alkohol- oder Alizarolprobe in verschiedenen Kombinationen.

Bundesland	Methylenblau-Reduktion	Resazurin-Reduktion	Alkohol-Probe	doppelte Alkohol-Probe	Alizarol-Probe	pH (elekt. / Indik.)	Säure-grad
Bayern	--	--	--	--	2	--	--
Baden-Württemberg	--	--	--	--	2	a	--
Rheinland-Pfalz	a	a	--	2	a	--	--
Saarland	--	--	--	2	--	2	a
Hessen	2	a	--	--	--	--	--
Nordrhein-Westfalen	2	a	--	--	--	--	--
Niedersachsen	3	a	--	--	--	--	--
Schleswig-Holstein	3	a	--	--	--	--	--
Hamburg	3	a	3	--	a	--	--
Berlin	2	a	--	--	--	--	--

Bemerkungen: Die Zahlen bedeuten die Anzahl der monatlich zu untersuchenden Proben.
a = alternativ zu einer korrespondierenden Methode.

ÜBERSICHT ÜBER DIE WESENTLICHEN UNTERSUCHUNGEN BEI DEN MONATLICHEN GÜTEPRÜFUNGEN DER ANLIEFERUNGSMILCH IN DEN VERSCHIEDENEN BUNDESLÄNDERN

Abbildung 1
(vereinfacht nach SOLTERBECK (15))

2.1.2.3.1. Redoxpotential

Das Prinzip der Reduktionsproben beruht auf einer Veränderung des Redoxpotentials der Milch, die durch reduzierende Fermente der in der Milch vorhandenen Bakterien bewirkt wird. Aus der Intensität der Verfärbung eines als Wasserstoffakzeptor der Milch zugesetzten Farbstoffes werden Rückschlüsse auf die Menge und Stärke der reduzierenden Fermente und damit der in der Milch vorhandenen Keime gezogen. Bei der Methylenblauprobe bestimmt man die bis zur Entfärbung des Methylenblaus bei 37°C erforderliche Zeit, bei der Resazurinprobe den nach einer Stunde bei 37°C resultierenden Farbton.

Normale Milch hat ein Redoxpotential zwischen + 360 und + 400 mVolt. In diesem Zustand besitzt sie weder erhebliche oxydierende noch reduzierende Eigenschaften (16). Je nach Aktivität der Bakterien fällt das Redoxpotential bis etwa -185 mVolt herab (17).

Auf das Reduktionsvermögen der Milch üben verschiedene Faktoren einen Einfluß aus:

Keimflora: Die Anzahl der Bakterien ist keinesfalls allein ausschlaggebend, sondern insbesondere die unterschiedliche Zusammensetzung der Keimflora: Das Vermögen zum fermentativen Abbau von Milchzucker ist bei den einzelnen Arten qualitativ und quantitativ sehr unterschiedlich ausgebildet (18). So ist bekannt, daß abgesehen von der vom Alter der Kultur abhängenden biochemischen Aktivität der Mikroben wie z. B. *E. coli* mit ihrer im Hinblick auf die Reduktion von Brenztraubensäure zu Milchsäure schwächeren Fermentaktivität eine geringere Reduktion der Milch bewirken als *Sc. lactis*. Im Extremfall, d. h. bei Vorliegen von Mikroben, die nur sehr spärlich oder überhaupt nicht mit diesen reduzierenden Fermenten ausgestattet sind, wie z. B. psychrotrophe oder hitzeresistente Keime (aerobe Sporenbildner), kann das dazu führen, daß eine Milch mit einem hohen Keimgehalt auf Grund der Reduktionsproben als keimarm eingestuft wird. Dieses unterschiedliche Reduktionsvermögen der verschiedenen Milchproben spiegelt sich in der starken Variabilität

der zwischen dem Logarithmus des Keimgehaltes und dem Reduktions-
ergebnis von Milch aus verschiedenen Stichproben (Aufbewahrungs-
bedingungen) errechneten Korrelationskoeffizienten wider (19, 20).

In enger Beziehung hierzu steht die Kaltlagerung der Milch, die zahlreiche
Bakterienarten stoffwechselphysiologisch inaktiv werden läßt, während
psychrotrophe Keime hierbei gute Wachstumsbedingungen vorfinden (21).
Die folgende Tabelle 1 veranschaulicht den Einfluß der Kühlung auf das
Reduktionsvermögen der Keime.

Tabelle 1

(nach BUNDESANST. FÜR MILCHFORSCHUNG (22))

AUSSAGEKRAFT DER RESAZURIN-REDUKTIONSPROBE UNTER BE - RÜCKSICHTIGUNG VERSCHIEDENER KÜHLSYSTEME			
Art der Kühlung	Elektronische Mikrokoloniezählung		Anzahl Betriebe
	linear r	logarithmisch r	
Keine	0,62	0,66	1 722
Wasser	0,42	0,60	1 938
Tauchkühler	0,32	0,38	490
Eiswasser	0,24	0,35	675
Kühlwanne	0,21	0,25	283

Wirkung milcheigener Enzyme: Hierbei spielen nicht allein das
Reduktionsvermögen von Spaltprodukten, sondern auch die Frei-
legung wachstumsfördernder oder durch Bakterienenzyme spalt-
barer Verbindungen aus der Milch eine Rolle (21).

Zutritt von Luft: Sauerstoff kann sowohl die Oxydation bereits reduzierter Farbstoffe bedingen, als auch Inhaltsstoffen der Milch bakteriestatische Eigenschaften verleihen (21).

Tageslicht kann zu einer den Test störenden Entfärbung des Indikators führen (23).

Ein stark erhöhter Leukozytengehalt bewirkt ebenfalls eine Reduktion des Farbstoffes (17).

2.1.2.3.2. Azidität und Eiweißstabilität

Für die Messung der Azidität und Eiweißstabilität in Rohmilch stehen verschiedene methodische Varianten zur Verfügung:

Aktueller Säuregrad

Die Ermittlung des aktuellen Säuregrades, worunter der tatsächlich wirksame, im Ionenzustand vorhandene Säureanteil - die Wasserstoffionenkonzentration - zu verstehen ist, kann sowohl auf kolorimetrischem als auch elektrometrischem Wege erfolgen. Die kolorimetrische Messung wird mit Hilfe von Indikatoren (Indikatorpapier oder -flüssigkeit) durchgeführt, die bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration unterschiedliche, wechselnde Farbtöne annehmen. Für die elektrometrische Messung des pH-Wertes in Milch ist am besten eine Glaselektrode geeignet, die eine direkte Ablesung des Potentials in pH-Werten ermöglicht.

Potentieller Säuregrad

Für die Feststellung des potentiellen Säuregrades in Milch -d.h. der gesamten in dieser Lösung enthaltenen Säuremenge und nicht nur des im Ionenzustand vorhandenen Anteils - stehen die Methode nach SOXLETH-HENKEL und die ROTE-LAUGE-PROBE zur Verfügung. Beide Verfahren beruhen auf Titrationen, deren Umschlagsbereiche durch Indikatoren gekennzeichnet sind.

Milch, die den pH-Wert von 6,5 um 0,1 - 0,3 unterschritten hat, ist nicht mehr erhitzungsfähig (24). Die entsprechenden Titrations-säuregrade liegen bei SH-Zahlen von 8,5 - 10.

Eiweißstabilität

Die sogenannten Alkoholproben dienen der indirekten Erfassung bakteriell bedingter glykolytischer Prozesse. Dies beruht auf der denaturierenden und dehydratisierenden Wirkung des Alkohols, der in Vermischung mit Milch eine Koagulation des Eiweißes auslösen kann. Die graduelle Auswirkung auf die Stabilität des Eiweißes ist abhängig von der Gerinnungsneigung der Milchproteine und der Konzentration des Alkohols in der Mischung. Je höher die Gerinnungsneigung der Proteine, desto geringer ist die Alkoholkonzentration, die zu einer Ausfällung führt.

In der Alkoholprobe wird Äthylalkohol in bestimmter Konzentration (z. B. 68 Vol. %) mit gleichen Teilen Milch (1 : 1) vermischt. Die Konzentration des Alkohols ist so gewählt, daß eine Gerinnung der Milch deren mangelhafte Pasteurisierungsfähigkeit anzeigt.

Eine Kombination von Indikatormethode und Alkoholprobe stellt die Alizarolprobe dar, bei der Äthylalkohol mit dem pH-Indikator Alizarin versetzt ist.

Da eine erhöhte Gerinnungsneigung der Milchproteine auch bei proteolytischen Veränderungen auftreten kann, sind diese Proben für die Erfassung der Glykolyse verhältnismäßig unspezifisch: Es wird mit ihrer Hilfe sowohl sauer- (glykolytisch veränderte) als auch süßgerinnende (proteolytisch veränderte) Milch festgestellt.

Die Alkoholprobe wird jedoch nicht nur für das Aussortieren der Milch mit ungenügender Thermostabilität verwendet, sondern auch heute noch für die Qualitätsbeurteilung und -bezahlung der Rohmilch herangezogen. Die damit als qualitätsmäßig schlecht bezeichneten Proben müssen als chemisch-physikalisch grob verändert angesehen werden (25). Säuregraderhöhungen, wie sie bei der derzeitigen Durchführung der Tests erkannt werden, entsprechen Keimzahlen

zwischen 5 und 25 Millionen/ml (26). Werte dieser Größenordnung dürften für die zukünftige Förderung der Rohmilchqualität kaum noch Bedeutung haben.

Hinzu kommt, daß das Reaktionsergebnis einer weitgehend subjektiven Beurteilung unterliegt: Die Verfärbung der Indikatoren und die Gerinnungserscheinungen werden visuell festgestellt. PH-Indikatoren zeigen jedoch eine gewisse Breite im Umschlagsbereich, innerhalb derer mit bloßem Auge nicht mehr ausreichend differenziert werden kann. Die notwendige sichere Erkennung einer pH-Veränderung um Einheiten von 0,1 ist daher nicht möglich. Die Ergebnisse sind deshalb nur schwer vergleichbar.

Somit sind diese Methoden lediglich dafür geeignet, nicht mehr erhitzungsfähige Milch zu erkennen. Für diese Zwecke haben sie zur schnellen Kontrolle bei Annahme der Milch ihre Bedeutung. Für die Beurteilung der hygienischen bzw. mikrobiologischen Qualität der Rohmilch ermöglichen sie jedoch keine genügend scharfe Differenzierung in Bezug auf die bakteriologische Beschaffenheit der Milch.

Für die Erfassung des glykolytischen Status bietet sich die quantitative Bestimmung der Milchsäure an. Bis vor kurzer Zeit fehlten jedoch die laboratoriumstechnischen Möglichkeiten, diesen Metaboliten der Glykolyse serienmäßig mit vertretbarem personellem Aufwand und hoher Sicherheit zu messen (27, 28, 29). Die Entwicklung des Prinzips der kontinuierlichen Durchflußanalyse hat hierzu neue Wege eröffnet.

2.1.2.4. Möglichkeiten zur Messung proteo- und lipolytischer Substratveränderungen

Da die quantitative Messung von Metaboliten der Proteo- und Lipolyse analog zur Milchsäurebestimmung als Maß für die Glykolyse im Rahmen von Serienuntersuchungen laboratoriumstechnisch bisher noch nicht möglich war, ist man auf die selektive Kultivierung proteolysierend wirkender Keime mit Hilfe z. B. des Calcium-Caseinat-Agars oder lipolysierender Keime mit Hilfe des Tributyrin-Agars angewiesen gewesen. Diese Methoden unter-

liegen bezüglich der Beurteilung der Veränderungen am Lebensmittel selbst den gleichen Einschränkungen wie alle kulturell-bakteriologischen Verfahren. Heute eröffnet die direkte Messung von Ammoniak als Maß für die Proteolyse und Freien Fettsäuren als solches für die Lipolyse (siehe Kapitel 2.1.2.2.) in der kontinuierlichen Durchflußanalyse neue Möglichkeiten.

2.1.2.5. Keimzählung unter psychrotrophen Wachstumsbedingungen

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Rohmilch, die sich bei Einhaltung der Kühlkette unter psychrotrophen Bedingungen entwickelt, kann in Hinsicht auf die täglich anfallende Materialmenge nur mit Hilfe eines automatisierten Verfahrens bewältigt werden. Dafür hat sich in letzter Zeit insbesondere die elektronische Mikrokoloniezählung bewährt. Ihr Prinzip besteht darin, daß in Rohmilch vorhandene Bakterien unterhalb der Oberfläche eines festen Nährmediums unter bestimmten Inkubationsbedingungen zu Mikrokolonien begrenzten Volumens heranwachsen und nach Fixation der Kolonien und Verflüssigung des Nährmediums - in einem Elektrolyten suspendiert - als geschlossene Partikel nach dem COULTER-Prinzip ausgezählt werden (22, 23).

Gegenüber dem klassischen KOCH' schen Plattenverfahren bietet die elektronische Mikrokoloniezählung eine Reihe von Vorteilen (22):

Die Präparation der Proben wird durch den Einsatz automatischer Pipettiergeräte wesentlich erleichtert und ist gleichzeitig durch das Ausschalten persönlicher Fehler der Untersuchenden gut standardisierbar. Pro Stunde können von einer Person bis zu 200 Proben für die Inkubation präpariert werden.

Durch die Auszählung von Mikrokolonien kann die Bebrütungszeit gegenüber dem KOCH' schen Plattenverfahren verkürzt werden, so daß die Ergebnisse schon nach einem Tag vorliegen.

Gegenüber der optischen Auszählung der einzelnen Kolonien, die den jeweiligen Untersuchern nur begrenzte Zeit zumutbar ist, bedeutet die elektronische Auszählung eine merkbare

physische Erleichterung. Als grober Anhaltspunkt kann gelten, daß pro Stunde von einer Person etwa 200 Proben ausgezählt werden.

Durch die Eichung der elektronischen Zählgeräte auf einen bestimmten Schwellenwert werden alle Kolonien bestimmter Größenordnung quantitativ ausgezählt, so daß die Fehler durch die individuelle Ermessensfreiheit darüber, was als Kolonie anzusehen ist, wegfallen. Damit ist die Auszählung gut standardisierbar.

Da durch die elektronische Auszählung das praktisch interessierende Spektrum koloniebildender Einheiten aus einer einzigen Milchverdünnung in 10 ml Nährgelatine festgestellt werden kann, entspricht der Materialaufwand dem einer einzigen KOCH' schen Platte.

Die relativ niedrige Verdünnung der Ansätze (1 : 500) hat zur Folge, daß bei hohen Keimzahlen durch die gegenseitige Beeinflussung der Keime mit zunehmender Einsaatdichte Bakterien am Wachstum (Koloniebildung) gehindert werden (sog. "Überfüllungsfehler"). Demzufolge ist es nahe-
liegend, daß die Werte der elektronischen Zählungen in den niederen Bereichen, etwa bis zu 1 Million Mikrokolonien, mit denen der unteren Verdünnungsstufe des KOCH' schen Verfahrens weitgehend übereinstimmen. Bei hohen Keimzahlen müssen die Zählwertdifferenzen zwischen beiden Methoden progressiv größer werden, wenn keine weiteren Verdünnungsstufen angesetzt werden.

Neben dem Überfüllungsfehler spielt für dieses Phänomen die Koinzidenz eine gewisse Rolle (22).

Die Ergebnisse der elektronischen Mikrokoloniezählung lassen sich direkt mit denen der optischen Koloniezählung vergleichen. Der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Zählmethoden beträgt linear $r = + 0,96$ und nach logarithmischer Transformierung der Zählwerte $r = + 0,99$ (22).

2.1.3. Pasteurisierungseffekt

Im Prinzip beruht die Hitzeinaktivierung von Bakterien darauf, daß ihnen in Form von Wärme kinetische Energie in solchem Maße zugeführt wird, daß die Proteinmoleküle durch Sprengung der Sulfid- und Wasserstoff-Brücken ihre innere Festigkeit verlieren, damit ihre innere Molekülstruktur ändern und ihre lebenswichtigen Funktionen nicht mehr ausführen können. Je mehr zwischenmolekulare Bindungen gelöst werden, desto größer ist die Denaturierung. Der Abtötungseffekt ist dabei als eine Funktion von Temperatur und Zeit bestimmt. Die Thermoresistenz ist zwar eine besondere Eigenschaft der Bakteriengattung und -art, hängt aber auch von der Keimzahl, der gegenwärtigen Wachstumsphase, dem Alter der Kultur sowie dem Medium ab.

Um eine sichere Hitzeinaktivierung pathogener Mikroorganismen in der Milch zu gewährleisten, ist es erforderlich, daß die zugeführte Wärmeenergie möglichst gleichmäßig alle grobdispers verteilten, kolloidalen und gelösten Bestandteile in der Milch erfaßt. Das wird im wesentlichen durch die Strömungsverhältnisse im Pasteur beeinflusst. Nur durch eine turbulente Strömung ist eine gute Durchmischung und damit eine gleiche Wärme konvektion vom Hitzemedium auf die Milch zu erreichen.

Bei einer Erhitzung bis zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase werden nach dem derzeitigen Stand der Kenntnisse alle pathogenen Mikroorganismen und ca. 90% - 99% aller saprophytären Bakterien abgetötet (33).

2.1.4. Rekontamination pasteurisierter Milch

Zwischen der Anzahl der Bakterien in roher und pasteurisierter Milch ist unter Praxisbedingungen kein systematischer Zusammenhang gültig (34). Psychrotrophe Keime werden durch die üblichen Pasteurisierungsverfahren nahezu vollständig abgetötet. Das Vorhandensein dieser Keime läßt also auf eine Rekontamination schließen. Die Hauptkontaminationsquelle liegt bei Abfüllgeräten, Luft, Spülwasser und Milchbehältern (35, 36, 37, 38, 39). Der Gehalt coliformer Keime in abgefüllter Trinkmilch liegt in der Größenordnung von 10/ml und bei loser Trinkmilch um etwa zwei Zehnerpotenzen höher. Dies läßt auf eine weitere Kontamination durch die Gerätschaften und Abfülleinrichtungen in den Geschäften schließen (40, 41).

Bakterienart und -flora geben bis zu einem gewissen Grad Anhaltspunkte für Fehler, die bei der Verarbeitung verursacht werden (35).

Unmittelbar nach der Pasteurisierung besteht die Milchflora überwiegend aus thermoduren Keimen und aeroben Sporenbildnern. Je höher die Pasteurisierungstemperatur liegt, desto größer ist die Anzahl der abgetöteten Säurebildner und desto besser sind die Wachstumsbedingungen für die Sporenbildner (siehe Kapitel 2.1.2.) (42).

2.1.5. Keimvermehrung in pasteurisierter Milch

Nach der Pasteurisierung können sich bei Wiedereintritt günstiger Inkubationsbedingungen die weiter lebensfähig gebliebenen und insbesondere die infolge einer Rekontamination in die Milch gelangten Keime rasch vermehren. In unzureichend gekühlter pasteurisierter Milch sind es - wie im Rohmilchbereich - vorwiegend die Bildner von Milchsäure, die sich durch die Unterdrückung des Wachstums anderer Bakterien, hier insbesondere der Thermoduren und aeroben Sporenbildner, zur dominierenden Keimflora entwickeln.

2.1.5.1. Messung des Keimgehaltes

Mit der Bestimmung des Keimgehaltes in pasteurisierter Milch wird sowohl der Anteil der die Erhitzung überlebenden als auch der durch eine Rekontamination in die Milch gelangten Keime erfaßt. Dabei ist aber nicht nur die Gesamtkeimzahl, sondern insbesondere auch der Gehalt der milchhygienisch bedeutsamen coliformen Keime von Interesse, für deren Quantifizierung eine Vielzahl von Verfahren zur Verfügung steht, von denen zwei besondere Beachtung finden:

2.1.5.1.1. Colititer

Unter coliformen Keimen werden alle Vertreter der Familie der Enterobacteriaceae verstanden, die bei 30° C innerhalb von 3 Tagen unter Gasbildung Laktose vergären. Die zu untersuchende Milch wird unverdünnt und in den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} in die mit 10 ml Brillantgrün-Galle-Laktose-Lösung pipettiert (43). Jede Probe wird doppelt angesetzt. Als positiv wird diejenige Verdünnungsstufe bezeichnet, bei der beide Röhrchen des Doppelansatzes ein Gasbläschen zeigen.

In unabhängigen Ansätzen ergibt sich für eine Stichprobe in der hierarchischen Varianzanalyse ein Varianzanteil von 13,6%. Hierin sind Stichprobenfehler, Pipettier- und Ablesefehler inkludiert. Der Korrelationskoeffizient zwischen unabhängigen Ansätzen beträgt $r = 0,86 (1)$.

2.1.5.1.2. Gesamtkeimzahl-Bestimmung im Plattenverfahren

Beim KOCH'schen Plattenverfahren werden in relativ großen Flüssigkeitsvolumina (z. B. 100 ml Kochsalzlösung) in Zehnerstufen Milchverdünnungen (z. B. 10^{-2} bis 10^{-6}) und aus den einzelnen Verdünnungsstufen im Gießverfahren sogenannte Verdünnungsplatten hergestellt. Dabei ist darauf zu achten, daß eine sorgfältige Mischung des Nährmediums mit der Milchverdünnung unter Kreisbewegungen stattfindet. Nach 48-stündiger Inkubation bei 30°C können die Kolonien makroskopisch unter Zuhilfenahme einer schwach vergrößernden Lupe ausgezählt werden. Zur Auswertung dienen Platten mit Koloniezahlen zwischen 30 und 300. Durch Multiplikation mit einem sich aus der Verdünnung ergebenden Faktor erhält man die Anzahl "koloniebildender Einheiten" je ml Ausgangsmilch. Nach den Empfehlungen der Kommission zur Vereinheitlichung der Untersuchungsmethoden für Milch und Milchprodukte sollen grundsätzlich zwei Ansätze erfolgen und das arithmetische Mittel der Koloniezahlen zweier Platten der Bewertung zu Grunde gelegt werden (44).

Für dieses Verfahren wird international ein Hefeextrakt-Trypton-Glukose-Nährmedium verwendet (44).

Alle kulturellen Methoden geben nur die Zahl der unter den gegebenen Nähr- und Wachstumsbedingungen lebenden Keime an, die - sobald sie sich zu Kolonien entwickelt haben - gleichgesetzt werden mit entwicklungs- bzw. vermehrungsfähigen Keimen. Dabei wird nicht in Betracht gezogen, daß die mangelnde Fähigkeit zur Vermehrung nicht identisch sein muß mit dem Tod der Mikroorganismen. Hinzu kommt, daß viele Mikroben zu Ketten oder Klumpen verschiedener Größen zusammengelagert sind, was besonders bei hohen Keimzahlen auftritt. Wenn diese Aggregationen nicht zerteilt werden, entwickelt sich aus ihnen jeweils nur eine einzige Kolonie. Das Ergebnis jeder Koloniezählung ist somit nur ein zahlenmäßiger Index über die koloniebildenden Einheiten, die in der Lage sind, bei einer bestimmten Temperatur unter bestimmten Nährstoff-, Sauerstoff- und

Raumverhältnissen zu wachsen. Hieraus ergibt sich, daß ein Vergleich von Koloniezählungen, die nach unterschiedlicher Inkubationsdauer und -temperatur erfolgen, nur sehr bedingt möglich ist (22, 45).

Es ist bekannt, daß selbst bei Vorliegen konstanter Bedingungen der Keimgehalt eine beträchtliche Variationsbreite aufweist und daß man daher die aus Analysen resultierenden Keimgehalte von vornherein als mit einer bestimmten numerischen Unschärfe behaftet ansehen muß. Im allgemeinen rechnet man auf Grund der gemäß POISSON verteilten Zellen in der Nähragarplatte damit, daß im Durchschnitt das Quadrat des Fehlers einer Einzelbestimmung von derselben Größenordnung ist wie die Anzahl der angewachsenen Kolonien. Als Ursachen für die z. T. erhebliche Variabilität des Keimgehaltes kommen folgende Faktoren in Frage (46):

Die Verdünnung der Ursprungssuspension, aus der die Proben für die Bestimmung auf dem Nähragar entnommen werden. Hieran sind die Graduierungsfehler der Pipetten, fehlerhafte Ablesungen, Unterschiede hinsichtlich der Menge und der Temperatur der Verdünnungsflüssigkeit und eine unterschiedliche Handhabung des Mischens der Stichprobe aus der Milch mit der Verdünnungsflüssigkeit durch Schütteln (Desintegration von Keimklumpen) beteiligt.

Der Stichprobenfehler: Auf Grund theoretischer und experimenteller Erkenntnisse wird der relative Stichprobenfehler mit Zunahme der Bakteriendichte kleiner.

Der Überfüllungsfehler, der sich in der Abnahme der Anzahl der Kolonien pro Platte infolge gegenseitiger Hemmung äußert.

Der Zählfehler - hervorgerufen durch unvollkommene Bedingungen beim Auszählen selbst, durch die unterschiedliche Auffassung der verschiedenen zur Auszählung herangezogenen Personen darüber, was als Zählobjekt im Medium anzusehen ist und durch die Variabilität der Zählergebnisse innerhalb und zwischen Einzelpersonen.

Modellversuche von LEMBKE und WASSERFALL (46) sowie von WASSERFALL (47) ergaben bei einer durchschnittlichen Koloniezahl von 179 in der 10^{-6} -Verdünnung einen Stichprobenfehler von $\pm 12,3$ und einen

durch die Verdünnungsreihe allein hervorgerufenen Fehler von $\pm 9,1$. Der aus beiden Fehlern zusammengesetzte Fehler zwischen den Verdünnungen betrug $\pm 31,3$. Die größte Keimzahl war in diesen Versuchen 1,5 mal so groß wie die kleinste (213 gegenüber 142 Kolonien). Dabei lagen in diesen Modellversuchen mit Sporensuspensionen wegen der homogenen Verteilung annähernd ideale Verhältnisse vor. Bei unhomogenen Bakteriensuspensionen, wie sie in der Milch beobachtet werden, verschlechterten sich die Verhältnisse beträchtlich. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß selbst die Berechnung eines mittleren Keimgehaltes aus mehreren Einzelbestimmungen in einer einzigen Verdünnungsflasche zu Fehlern führt, die in der Größenordnung von 200% bis 300% liegen. Diese Untersuchungen stehen in Übereinstimmung mit den Angaben von WILSON (48), der festgestellt hat, daß im KOCH'schen Plattenverfahren bei Vorliegen einer Einzelbeobachtung von 300 000 Keimen der wirkliche Keimgehalt bei $300\,000 \pm 75\%$ (dementsprechend 75 000 bis 525 000 Keime) um diesen Wert variiert.

2.2. Stellung von Pyruvat im Stoffwechselgeschehen

Pyruvat ist das Salz der Brenztraubensäure, deren chemische Formel



ist. Es steht im Mittelpunkt des bakteriellen Katabolismus unmittelbar vor dem Eingang in den Zitronensäurezyklus. Die Abbildung 2 schematisiert die Abbauege der drei Stoffwechselsubstanzen (siehe Kapitel 2.1.2.1. und 2.1.2.2.):

Glykolyse: Brenztraubensäure erscheint als direktes Endprodukt der Glykolyse im FDP- und KDPG-Weg. Über den PP-Weg werden Hexose-Phosphate, die in die Glukose-oxydation eingehen können, und Triose-Phosphate gebildet, die entweder über den FDP-Weg abgebaut werden oder zu Hexose-Molekülen kondensieren. Indirekt entsteht auch über den PP-Weg Brenztraubensäure.

Proteolyse: Mit Hilfe von Enzymen werden die Proteine in Aminosäuren zerlegt, die entweder decarboxyliert oder desaminiert werden. Als Desaminierungsprodukt kann Brenztraubensäure entstehen. Andere Kohlenstoffskelette der Aminosäuren werden über spezielle Abbauege in die Bahnen des Intermediärstoffwechsels eingeschleust.

Lipolyse: Unter Einwirkung von Lipasen entstehen aus Neutralfetten Glycerin und freie Fettsäuren. Glycerin wird in den Abbauweg der Kohlenhydrate eingeschleust, wobei als Endprodukte Pyruvat bzw. aktivierte Essigsäure entstehen.

Die Abbildung 2 soll einen Hinweis darauf geben, daß eine Zunahme glyko-, proteo- und lipolytischer Prozesse eine Ansammlung von Pyruvat (Pyruvat-Pool) und eine weitere Verstoffwechselung dieser Substanzen zur Folge hat.

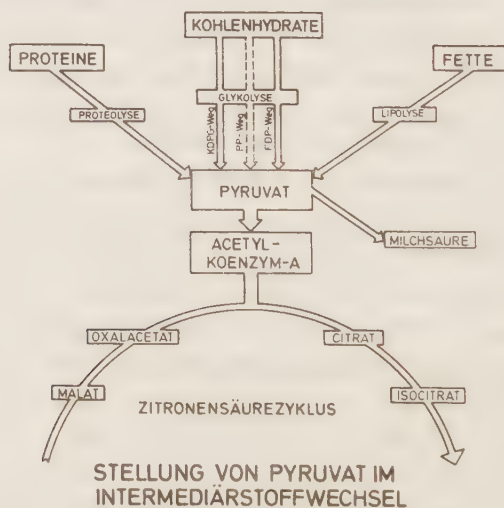


Abbildung 2

Die quantitative Bestimmung der Brenztraubensäure müßte somit eine Aussage über die glyko-, proteo- und lipolytische Aktivität der Keimflora in Milch ermöglichen. Sie kann sowohl photometrisch als auch fluorometrisch erfolgen (49, 50, 51, 52). Dabei wird Pyruvat enzymatisch (LDH) in Laktat überführt, wobei NADH oxydiert wird. Die Oxydation des NADH ist dem Pyruvatumsatz proportional und wird bei 340 oder 366 nm gemessen. Vor der Messung findet eine manuelle Entfettung und Enteiweißung statt.

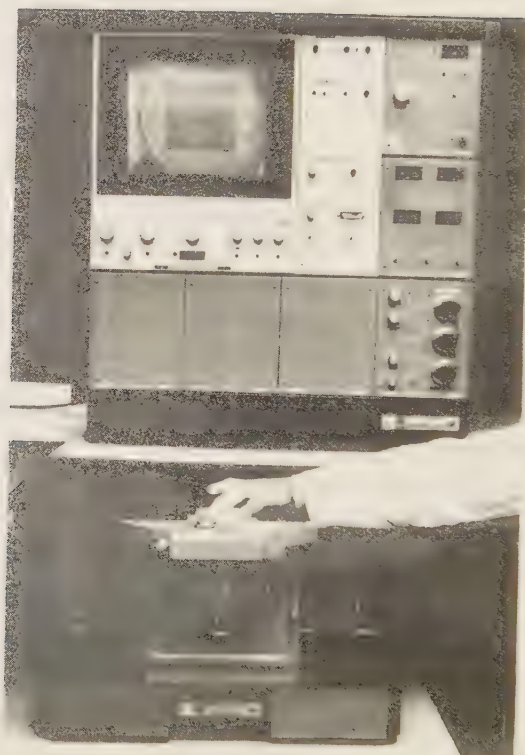
Für die eigenen Untersuchungen wurde diese enzymatische Pyruvatbestimmung auf das System der kontinuierlichen Durchflußanalyse transformiert (siehe Kapitel 3.2.1.1.).

2.3. Automatisierung der Keimzählung von Plattenkulturen

In den bakteriologischen Laboratorien lebensmittelhygienischer Institute müssen täglich Hunderte von Kulturplatten zur quantitativen Schätzung der Lebendkeimzahl oder selektiven Erfassung bestimmter Keime gezählt werden - eine Tätigkeit, die die menschliche Arbeitskraft stark belastet und mit zahlreichen Fehlermöglichkeiten behaftet ist. Für das Prinzip der rein quantitativen Erfassung von Bakterienkolonien drängt sich dabei unter den heutigen technischen Möglichkeiten eine Automatisierung geradezu auf. Damit könnte das Untersuchungspersonal auch für wesentlichere Aufgaben freigestellt werden. Neben der Personal-, Zeit- und Kostenersparnis sollte aber gleichzeitig angestrebt werden, die Zuverlässigkeit der gewonnenen Meßdaten und den Informationsfluß zu erhöhen.

Hierfür bietet sich die Computer-Bild-Analyse an, die bisher schon in der Metallographie, Festkörperphysik, Mineralogie, Neurologie, Histochemie, Histologie, Autoradiographie, Fasertechnologie und anderen Arbeitsgebieten ihre Erprobung fand. Es gibt bis zu tausend Möglichkeiten, aus den Computer-Bild-Analysator-Bausteinen (Quantimet 720) ein Gerät zusammenzustellen, das im Mikro- und Makrobereich jedes Teilchen einzeln erfaßt, zählt, vermißt und klassifiziert. Das Gerät erledigt diese Aufgabe wesentlich schneller, zuverlässiger und genauer als menschliche Arbeitskräfte, so daß heute mit seiner Hilfe wichtige, aber bisher in der Durchführung zu aufwendige Arbeiten in Wissenschaft und Qualitätskontrolle rationell bearbeitet werden können (53).

Das Computer-Bild-Analysator-System für die kulturell-bakteriologische Untersuchung wird als Gesamtansicht in Abbildung 3 wiedergegeben (siehe auch Kapitel 3.2.2.).



COMPUTER-BILD-ANALYSE MIT DEM QUANTIMET 720

Abbildung 3

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

3.1.1. Proben für die sequentielle Pyruvatbestimmung nach experimenteller Kontamination steriler Rohmilch mit Reinkulturen

Voraussetzung für die Messung von Pyruvat in Milch als zentralem Stoffwechselprodukt definierter Reinkulturen ist das Vorhandensein eines keimfreien, nativen Substrates aus einer gesunden Milchdrüse, dessen Gewinnung im Kapitel 3.3. beschrieben wird. In dieser Versuchsserie wurde diese Milch zur Inaktivierung milchoriginärer Enzyme auf 60°C für 30 - 120 Minuten erhitzt und mit definierten Reinkulturen der wichtigsten in Milch vorkommenden saprophytären Mikroorganismen beimpft. Die Thermisierungszeit richtet sich nach der geplanten Versuchsdauer (5 - 14 Tage). Die Inkubation der beimpften, sterilen und thermisierten Proben erfolgte bei 6°C und 9°C unter vorwiegender Berücksichtigung psychrotropher Bedingungen. Die bakteriologischen Untersuchungen und biochemischen Analysen der Proben erstreckten sich über mindestens 5 und höchstens 10 Tage. Die milchhygienisch als bedeutsam angesehenen Bakteriengruppen bestehen aus Milchsäure-Streptokokken (5 Stämme), Enterokokken (10 Stämme), Pseudomonaden und coliformen Keimen (jeweils 25 Stämme).

Zur Inokulation der Milchproben dienten Bouillonkulturen, deren Dichte durch optisches Auszählen bekannt war. Die Einimpfmenge wurde so eingestellt, daß 100 000 ± 30 000 Keime/ml des Substrates im KOCH'schen Plattenverfahren nachweisbar waren. Diese Einimpfmenge ist durch jeweils mehrere Ansätze über die Computer-Bild-Analyse von Plattenkulturen kontrolliert worden.

Zur Überprüfung der einwandfreien bakteriologischen Beschaffenheit der thermisierten Milch wurden Kontrollproben bei den unterschiedlichen Temperaturen mitgeführt. Nur solche Versuche kamen zur Auswertung, bei denen in den Kontrollen während der Versuchsdauer keine glyko-, proteo- und lipolytischen Prozesse feststellbar waren.

3.1.2. Proben für die sequentielle Pyruvatbestimmung in roher Sammelmilch und pasteurisierter Trinkmilch

320 Proben roher Sammelmilch und 378 Proben pasteurisierter Trinkmilch wurden in Standversuchen bei 6°C , 9°C und 12°C in Zeitreihen bakteriologisch und biochemisch auf Produkte des Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsels sowie teilweise (100 Proben) auf Reduktionsvermögen, Eiweißstabilität und sensorisch wahrnehmbare Eigenschaften untersucht. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte in Wärme-Kälteschränken mit einer Temperaturregelgenauigkeit von $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ über mindestens 5 Tage. Bei einem Teil der Proben wurden die bakteriologischen und biochemischen Untersuchungen bis zu ihrem Verderb täglich durchgeführt.

3.1.3. Einmalige Stichproben für Pyruvatbestimmungen in Viertelgemelken und roher Sammelmilch

Zur Prüfung von Sicherheit, Aussagekraft und Praktikabilität der Pyruvat-Bestimmung wurden

1. 2 041 Viertelgemelksproben von 528 Kühen aus 30 Beständen nach 12- bis 24-stündiger Konservierung mit einem Kaliumsorbat-Borsäure-Gemisch (22) bakteriologisch, zytologisch und biochemisch untersucht und die Ergebnisse zu laktationsphysiologischen Daten der einzelnen Tiere in Beziehung gesetzt

- und
2. 1 709 Proben roher Sammelmilch auf eine Reihe physikalisch-chemischer und bakteriologischer Parameter analysiert. Diese Proben wurden bei einer Aufbewahrungstemperatur von 0°C innerhalb von 5 Stunden nach der Entnahme verarbeitet. Zur Sicherung der methodischen Fehlerbreite dienten zwei unabhängige Ansätze.

3.1.4. Proben roher Sammelmilch für Pasteurisierungsversuche

Zur Prüfung des Pyruvatgehaltes in Abhängigkeit von der Pasteurisierung wurden

1. im Vorversuch an 165 Proben roher Sammelmilch (jeweils 5 ml) eine Hoherhitzung (85°C / 10 Sek.) unter Anwendung eines Labor-Wasserbades durchgeführt
- und 2. im Hauptversuch an 160 Proben roher Sammelmilch (jeweils 1 - 2 Liter) eine Kurzzeiterhitzung (71°C / 40 Sek.) über einen Labor-Pasteur vorgenommen. 60 dieser Proben wurden über 5 Tage bei einer Aufbewahrungstemperatur der Milch von 6°C jeweils täglich pasteurisiert.

Unmittelbar vor und nach jeder Pasteurisierung ist der Pyruvat-Pool gemessen worden.

- 3.1.5. Einmalige Stichproben aus roher Sammelmilch und pasteurisierter Trinkmilch für die kulturell-bakteriologische Untersuchung mit Hilfe der Computer-Bild-Analyse

Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl, der Streptokokken, Enterokokken, coliformen, thermoduren und psychrotrophen Keime im Computer-Bild-Analysator wurden jeweils ca. 100 Proben roher Sammelmilch und pasteurisierter Trinkmilch entnommen und in zwei unabhängigen Ansätzen die für die einzelnen Keimgruppen gebräuchlichen Koloniezählverfahren angewendet (siehe auch Kapitel 3.2.2.1.).

3.2. Methodik

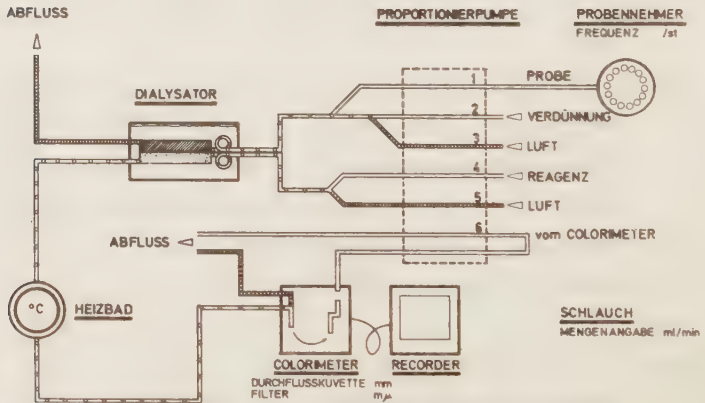
- 3.2.1. Messung von Stoffwechselfparametern des bakteriellen Katabolismus in der kontinuierlichen Durchflußanalyse

Bis vor kurzer Zeit lagen über Milchanalysen in der erstmalig 1957 von SKEGGS (54) beschriebenen kontinuierlichen Durchflußanalyse im Auto-Analyzer-System nur wenig Informationen vor (55, 56, 57). Der hohe Gehalt an Fett und Kasein in der Milch hat über lange Zeit die Aufbereitung der Proben erschwert - ein Problem, das erst jetzt gelöst werden konnte, so daß nun eine große Anzahl von Milchinhaltsstoffen serienmäßig mit vertretbarem personellen Aufwand und hoher Sicherheit untersucht und ausgewertet werden kann (17).

Im Auto-Analyzer-System läuft kontinuierlich zwischen Proben und Reagenzien eine Reaktion ab, die bei maximaler Intensität ("Steady-State") kolorimetrisch oder fluorometrisch gemessen wird. Die Mengenverhältnisse von Proben und Reagenzien werden über eine Proportionierpumpe durch das Lumen der die Reaktionspartner enthaltenden Schläuche

bestimmt. Jedes fließende Reaktionsgemisch ist durch Luftblasen vom vorhergehenden und nachfolgenden abgetrennt. Durch Schlauchverbindungen wird der Reaktionsstrom von einem Baustein des Systems zum anderen geleitet, von dem jeder eine bestimmte analytische Funktion erfüllt. Durch den regelmäßigen Austausch einzelner Proben durch Standard- oder Eichlösungen wird das System laufend überprüft und gegebenenfalls kalibriert (17).

In der Darstellung der Abbildung 4 sind die Einzelheiten schematisch aufgezeichnet:



SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GRUNDEINHEITEN
DES AUTO-ANALYZER-SYSTEMS UND ANALYTISCHE FUNKTION

Abbildung 4

3.2.1.1. Pyruvat

3.2.1.1.1. Prinzip der Methodik

Pyruvat wird bei gleichzeitiger Oxydation von NADH_2 in Anwesenheit des Enzyms LDH zu Laktat reduziert (s. Abb. 5).



SCHEMA DER ENZYMATISCHEN PYRUVAT-BESTIMMUNG

Abbildung 5

3.2.1.1.2. Kurzbeschreibung (Flußdiagramm s. Abb. 6)

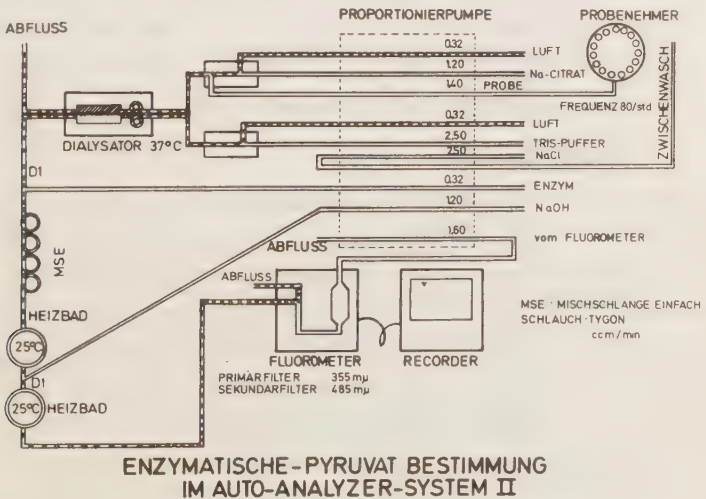


Abbildung 6

1, 40 ml der Milchprobe werden mit 1, 20 ml Natriumcitrat-Lösung verdünnt und mit 0, 32 ml Luft segmentiert. Die Dialyse erfolgt bei 37° C gegen mit Luft segmentierten Tris-Puffer. Dem Dialysat (2, 50 ml Tris-Puffer + 0, 32 ml Luft) werden 0, 32 ml Enzym-Arbeitslösung hinzugefügt. Nach gründlichem Durchmischen in einer einfachen Mischschlange läuft in einem Ölbad bei 25° C die Reaktion ab. Durch Hinzufügen von 1, 20 ml 1 n NaOH und anschließendem Verweilen in einem Ölbad bei 25° C wird eine Stabilisierung der Basislinie erreicht.

3.2.1.1.3. Reagenzien

Natriumcitrat-Lösung

Natriumcitrat		50,0	g
Aqua dest.	ad	1000,0	ml

Tris-Puffer

Tris		6,05	g
Aqua dest.	ad	900,0	ml
Einstellen mit konzentrierter			
HCl auf pH = 7, 6			
Auffüllen mit Aqua dest.	ad	1000,0	ml

Natronlauge (1 n)

Natriumhydroxid (Plätzchen)		40,0	g
Aqua dest.	ad	1000,0	ml
0,1 m Titriplex III		30,0	ml

NADH₂-Vorratslösung

NADH + H ⁺ (Na-Salz von Merck)		0,05	g
Tris-Puffer pH = 9, 7	ad	100,0	ml
(Tris 6,05 g, Aqua dest. ad 900,0 ml)			
Aufbewahrung im Kühlschrank			

Enzym-Arbeitslösung

NADH + H ⁺ -Vorratslösung		5,0	ml
LDH (aus Kaninchenmuskel)		0,4	ml
Tris-Puffer pH = 9, 7	ad	100,0	ml
(Tris 6,05 g, Aqua dest. ad 900,0 ml)			

Ansetzen jeweils eines Tagesbedarfs

Vorrats-Pyruvat-Lösung (100 mg/100 ml)

Pyruvat (Na-Salz)		0,123	g
Aqua dest.	ad	100,0	ml

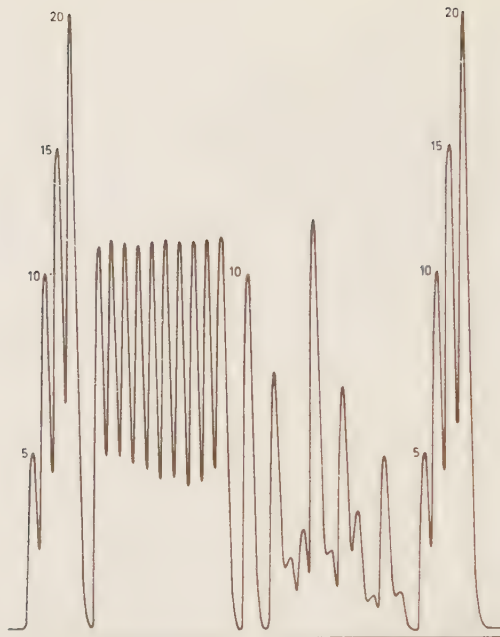
Arbeitsstandards zur Pyruvatbestimmung

Vorratslösung (ml)	ad Aqua dest. (ml)	mg Pyruvat/100 ml
0,2	100	0,2
0,5	100	0,5
1,0	100	1,0
1,5	100	1,5
2,0	100	2,0
2,5	100	2,5
3,0	100	3,0

3.2.1.1.4. Sicherheit der Methodik

In unabhängigen Ansätzen ergab sich für eine Stichprobe aus dem vorliegenden Material in der hierarchischen Varianzanalyse ein Varianzanteil von 0,29%. Hierin sind Analysen- und Systemfehler sowie die Fehler der Stichprobe inkludiert. Der Korrelationskoeffizient zwischen Ansätzen beträgt daher $r = + 0,99$.

Die folgende Abbildung zeigt den Kurvenverlauf von 4 Arbeitsstandards, einer Wiederholungsreihe einer Milchprobe und 10 unterschiedlichen Milchproben bei einer Geschwindigkeit von 80 pro Stunde. Die Wiederholungsreihe gibt die hohe Reproduzierbarkeit der Pyruvatbestimmung im Auto-Analyzer-System wieder.



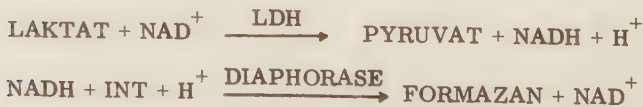
Pyruvat-Chromatogramm (Frequenz 80/Std.)
 (4 Arbeitsstandards (ppm), Wiederholungsreihe einer Milch-
 probe, 10 unterschiedliche Milchproben)

Abbildung 7

3.2.1.2. L- (+) Milchsäure

3.2.1.2.1. Prinzip der Methodik (17, 58)

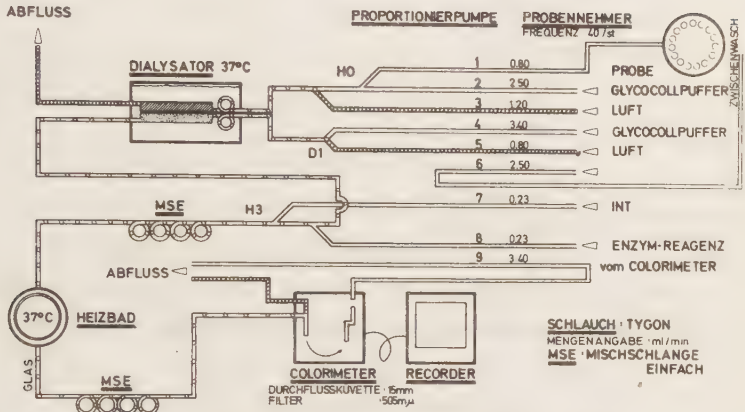
Laktat wird bei gleichzeitiger Reduktion von NAD zu Pyruvat oxydiert. Das reduzierte Coenzym, NADH, wird durch das Enzym Diaphorase oxydiert. Dabei wird der Elektronenakzeptor INT (3-p-Nitrophenyl-2-p-Iodophenyl-Tetrazoliumchlorid) zu Formazan umgewandelt, das eine starke Absorption bei 505 mμ besitzt. Das Reaktionsschema läßt sich wie folgt darstellen (s. Abb. 8):



SCHEMA DER ENZYMATISCHEN MILCHSÄURE-BESTIMMUNG

Abbildung 8

3.2.1.2.2. Kurzbeschreibung (Flußdiagramm s. Abb. 9)



ENZYMATISCHE MILCHSÄURE-BESTIMMUNG IM AUTO-ANALYZER-SYSTEM.

Abbildung 9

0,8 ml der Milchprobe werden mit 2,50 ml Glycocollpuffer verdünnt und mit 1,20 ml Luft segmentiert. Die Dialyse erfolgt bei 37°C gegen ein luftsegmentiertes Glycocollpuffer-Gemisch (0,8 ml Luft, 3,40 ml Glycocollpuffer). Dem Dialysat werden 0,23 ml INT und 0,23 ml "Enzym" zugeführt. Nach gründlichem Durchmischen erfolgt die Farbentwicklung bei 37°C im Heizbad. Die auftretende Farbabweichung wird bei 505 mμ in einer 15-mm-Durchflußküvette gemessen.

3.2.1.2.3. Reagenzien

Natriumcitrat-Lösung

Natriumcitrat		50,0	g
Aqua dest.	ad	1000,0	ml

Glycocollpuffer

Glycocoll		7,5	g
Triton-X-100		15,0	ml
Aqua dest.	ad	1000,0	ml

Einstellung mit Natriumhydroxid auf pH 9,6
(Plätzchen)

INT-Farbreagenz

INT		0,625	g
Aqua dest.	ad	1000,0	ml

Aufbewahrung im Kühlschrank in brauner Flasche

Phosphatpuffer (pH 7,4, 1 M)-Vorrat

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)		136,0	g
Natriumhydroxid (Plätzchen)		33,0	g
Aqua dest.	ad	1000,0	ml

Leerwert-Lösung (pH 7,4; 0,15% Albumin)

Phosphatpuffer (Vorrat)		13,4	ml
Bovines Albumin		0,3	g
Aqua dest.	ad	200,0	ml

Aufbewahrung im Kühlschrank

NAD (DPN)-Diaphorase

Diaphorase		2,0	ml
Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid		1,2	g
Leerwertlösung		200,0	ml

Aufbewahrung im Kühlschrank

Arbeitslösung ("Enzym")

Laktat-Dehydrogenase			
(LDH, aus Kaninchenmuskel) (10 mg/2 ml)		1,0	ml
NAD (DPN)-Diaphorase		50,0	ml

Ansetzen jeweils eines Tagesbedarfs

Vorrats-Milchsäure-Lösung (100 mg/100 ml)

L-(+)-Milchsäure-Li-Salz		0,107	g
Glycocollpuffer	ad	100,0	ml

1, 20 ml der Milchprobe werden mit 2, 50 ml Natriumpolyphosphatlösung verdünnt und mit 0, 80 ml Luft segmentiert. Die Dialyse erfolgt bei 37° C gegen ein Gemisch aus 2, 90 ml Natriumpolyphosphat und 0, 80 ml Luft. Das Dialysat wird mit 0, 60 ml Natronlauge versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 0, 60 ml Farbreagenz. Nach gründlichem Durchmischen werden 0, 60 ml Cyanurchlorid-Lösung zugefügt. Nach nochmaligem Durchmischen in einer Mischschlange erfolgt im Heizbad bei 37° C die Farbentwicklung. Zur kolorimetrischen Bestimmung dienen 610 μ -Filter und eine Durchflußkivette von 15 mm.

3. 2. 1. 3. 3. Reagenzien

Natriumpolyphosphat-Lösung

Natriumhexametaphosphat		5, 0	g
Aqua dest.	ad	1000, 0	ml

Nitroprussidnatrium-Natriumsalicylat-Lösung

Nitroprussidnatrium		0, 6	g
Natriumsalicylat		85, 0	g
Aqua dest.	ad	1000, 0	ml

Natronlauge (0, 3 n)

Natriumhydroxid (Plätzchen)		12, 0	g
Aqua dest.	ad	1000, 0	ml

Natriumdichlorcyanurat-Lösung

Natriumdichlorcyanurat		0, 15	g
Aqua dest.	ad	1000, 0	ml

Vorrats-Ammoniak-Lösung (100 mg NH₃/100 ml)

Ammoniumsulfat		0, 388	g
Aqua dest.	ad	1000, 0	ml

Arbeitsstandards zur Ammoniak-Bestimmung

Vorratslösung (ml)	ad Aqua dest. (ml)	mg NH ₃ /100 ml
0, 1	100	0, 1
0, 3	100	0, 3
0, 6	100	0, 6
0, 9	100	0, 9
1, 2	100	1, 2
1, 5	100	1, 5
1, 8	100	1, 8

3.2.1.3.4. Sicherheit der Methodik

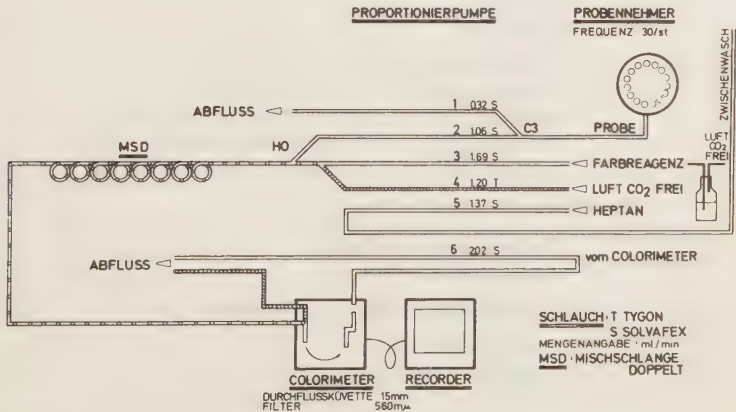
In unabhängigen Ansätzen ergab sich für eine Stichprobe aus dem vorliegenden Material in der hierarchischen Varianzanalyse ein Varianzanteil von 5,62%. Hierin sind Analysen- und Systemfehler sowie die Fehler der Stichprobe inkludiert. Der Korrelationskoeffizient zwischen Ansätzen beträgt daher $r = + 0,94$.

3.2.1.4. Freie Fettsäuren

3.2.1.4.1. Prinzip der Methodik (17, 60)

Die freien Fettsäuren werden mittels eines Extraktionsgemisches aus der Milchprobe extrahiert. Die freigesetzten Fettsäuren werden über einen Indikator quantitativ erfaßt.

3.2.1.4.2. Kurzbeschreibung (Flußdiagramm s. Abb. 11)



FREIE FETTSÄUREN-BESTIMMUNG IM AUTO-ANALYZER-SYSTEM.

Abbildung 11

1,0 ml Milch werden mit 5,0 ml des Extraktionsgemisches (Isopropylalkohol, Heptan, 1 n Schwefelsäure) vermischt und gründlich geschüttelt (Schüttel-apparat). Anschließend werden 3,0 ml Heptan und 2,0 ml Aqua dest. zu-gefügt. Erneut wird für die Dauer von 10 Minuten kräftig geschüttelt. Nach Phasentrennung (5 Minuten) wird der Überstand abpipettiert und im Auto-Analyzer-System untersucht. Hierzu werden 1,06 ml der Probe mit 1,69 ml Farbreagenz vermischt und mit 1,20 ml CO₂-freier Luft segmentiert. Nach gründlichem Durchmischen in einer Doppelmischschlange erfolgt die Messung der Farbänderung des Indikators bei 560 mμ in einer 15-mm-Durchfluß-kivette im Colorimeter.

3.2.1.4.3. Reagenzien

Extraktionsgemisch

Isopropylalkohol (Propanol)	1600,0	ml
Heptan	400,0	ml
1 n Schwefelsäure	40,0	ml

Pufferlösung (Vorrat)

Natriumbarbitol	2,5	g
Phenolrot	1,0	g
Aqua dest. ad	100,0	ml

Natriumbarbitol wird in ca. 50 ml dest. Wassers bei 60° - 70° C gelöst. An-schließend wird Phenolrot hinzugefügt und vollständig aufgelöst. Die Aufbewahrung der Pufferlösung muß in brauner Flasche erfolgen.

Farbreagenz

Pufferlösung (Vorrat)	0,75	ml
Vergällter Alkohol	300,0	ml

Vorrats-Fettsäure-Lösung (4,0 mÄqu./l)

Palmitinsäure	0,205	g
Heptan ad	200,0	ml

Arbeitsstandards zur Bestimmung freier Fettsäure/l

Vorratslösung (ml)	ad Heptan (ml)	mÄqu. Fettsäure/l
2,5	100	0,1
5,0	100	0,2
10,0	100	0,4
20,0	100	0,8

Der Arbeitsstandard wird vor Gebrauch wie die Milchprobe behandelt.

3.2.1.4.4. Sicherheit der Methodik

In unabhängigen Ansätzen ergab sich für eine Stichprobe aus dem vorliegenden Material in der hierarchischen Varianzanalyse ein Varianzanteil von 4,14%. Hierin sind Analysen- und Systemfehler sowie die Fehler der Stichprobe inkludiert. Der Korrelationskoeffizient zwischen Ansätzen beträgt daher $r = + 0,96$.

3.2.2. Kulturell-bakteriologische Untersuchung mit Hilfe der Computer-Bild-Analyse

3.2.2.1. Präparation der Kulturplatte

Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl und die selektive Erfassung bestimmter Keimgruppen wurden die im folgenden aufgeführten Nährmedien verwendet.

Gesamtkeimzahl

Hefeextrakt-Trypton-Glukose-Agar (44)

Trypton	5,0 g	
Hefe-Extrakt	2,5 g	
Glukose	1,0 g	pH = 7,0
Agar	15,0 g	
Aqua dest.	ad	1000,0 ml

Das Nährmedium wurde 15 Minuten bei 120° C autoklaviert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml steriler Magermilch/
1 Liter Nährmedium.

Es wurden alle Keime erfaßt, die innerhalb von 48 Stunden bei 30° C makroskopisch erkennbare Kolonien bildeten.

Coliforme Keime

Violet-Red-Bile-Agar (44)

Hefeextrakt	3,0	g	
Pepton	7,0	g	
Kochsalz	5,0	g	
Gallensalz	1,5	g	
Laktose	10,0	g	pH = 7,4
Neutralrot	0,03	g	
Kristallviolett	0,002	g	
Agar-Agar	12,0	g	
Aqua dest.	ad	1000,0	ml

Es wurden alle Keime erfaßt, die innerhalb von 24 Stunden bei 30° C 1 - 2 mm große dunkelrote Kolonien bildeten, die meistens von einer rötlichen Zone umgeben waren.

Gesamt-Streptokokken

Streptosele-Agar mit Kanamycin (Gramm pro Liter) (61)

Trypticase	15,0
Phyton	5,0
Natriumchlorid	4,0
Natriumcitrat	1,0
L-Cystin	0,2
Natriumsulfit	0,2
Glukose	5,0
Natriumazid	0,2
Kristallviolett	0,0002
Agar	12,0

Die Nährbodengrundlage wurde 15 Minuten bei 118° C autoklaviert.

Zur Hemmung der Begleitflora wurde dem sterilisierten und auf 45° C abgekühlten Nährboden Kanamycin in einer Menge von 2 γ/ml zugesetzt (62).

Es wurden alle Keime erfaßt, die innerhalb von 48 Stunden bei 37° C makroskopisch sichtbare Kolonien bildeten.

Enterokokken

Für die selektive Züchtung von Enterokokken wurde der bei der Bestimmung der Streptokokkenzahl angegebene Agar mit Streptoselektivbroth und Kanamycin verwendet, dem nach dem Autoklavieren der Nährboden Grundlagen 20,0 g Trockengalle hinzugefügt wurden (61, 62). Anschließend wurde das Gesamtmedium 1 Stunde im Dampftopf sterilisiert.

Es wurden alle Keime erfaßt, die innerhalb von 72 Stunden bei 42° C makroskopisch sichtbare Kolonien bildeten.

Pseudomonaden einschließlich Aeromonaden

Glutaminat-Penicillin-Agar (63)

KH_2PO_4	2,0 g	
MgSO_4	0,5 g	
Na-L (+)-Glutaminat	10,0 g	pH = 7,2
Aqua dest.	ad 900,0 ml	

Diesem Gemisch wurden 15,0 g Agar-Agar hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20,0 g Stärke (in 100,0 ml Aqua dest. gelöst) und 18,0 ml 2%ige Phenolrotlösung.

Nach dem Sterilisieren und Abkühlen auf 45° C bis 50° C wurden 100 000 IE Penicillin-G-Natrium hinzugefügt.

Es wurden alle Keime erfaßt, die innerhalb von 72 Stunden bei 25° C makroskopisch sichtbare Kolonien bildeten.

Thermophile Keime

Für die selektive Züchtung der Thermophilen wurde der bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl angegebene Hefeextrakt-Trypton-Glukose-Agar unter Zusatz steriler Magermilch verwendet. Es wurden alle Keime erfaßt, die nach vorheriger Erhitzung auf 62,3° C über 30 Minuten innerhalb von 72 Stunden bei 30° C makroskopisch sichtbare Kolonien bildeten.

Psychrophile Keime

Für die selektive Züchtung psychrophiler Keime wurde der bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl angegebene Hefeextrakt-Trypton-Glukose-Agar unter Zusatz steriler Magermilch verwendet.

Es wurden alle Keime erfaßt, die innerhalb von 10 Tagen bei 7° C makroskopisch sichtbare Kolonien bildeten.

Die folgende Tabelle 2 gibt einen Überblick über die für die Gesamtkeimzahl-Bestimmung und Selektivzählung von Keimgruppen in roher und pasteurisierter Milch verwendeten Nährmedien, Verdünnungsstufen und deren Bebrütungszeit und -temperatur.

Tabelle 2

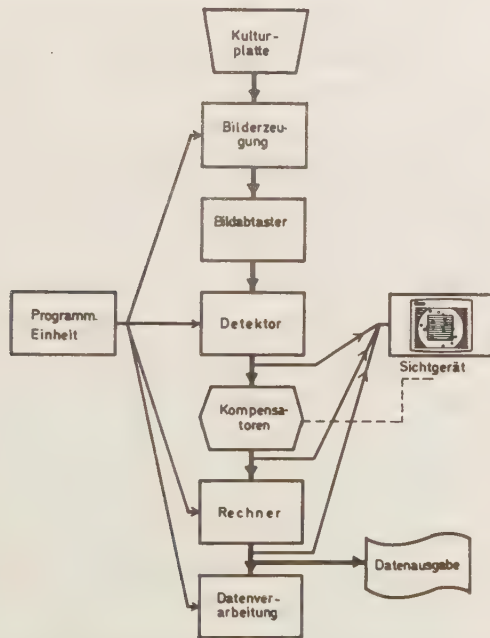
DARSTELLUNG DER FÜR DIE EINZELNEN KEIMGRUPPEN VERWENDETEN NÄHRMEDIE, VERDÜNNUNGSSTUFEN UND DEREN BEBRÜTUNGSZEIT UND -TEMPERATUR (ROHE UND PASTEURISIERTE MILCH)					
	Nähr- medium	Bebrütungs- temperatur in °C	Bebrütungs- dauer in Stunden	Trinkmilch Verdünnungs- stufen	Robmilch Verdünnungs- stufen
Gesamt- keimzahl	Hefeextrakt- Trypton- Glukose- Agar	30	48	$10^{-1} - 10^{-3}$	$10^{-3} - 10^{-4}$
Coliforme Keime	Violet-Red- Bile-Agar	30	24	--	$10^{-1} - 10^{-2}$
Gesamt- Strepto- kokken	Streptosel- Agar mit Kanamylin	37	48	$10^{-1} - 10^{-2}$	$10^{-3} - 10^{-4}$
Entero- kokken	Streptosel- Agar mit Kanamylin + Galle	42	72	$10^{-2} - 10^{-3}$	--
Pseudo- monaden u. Aero- monaden	Glutamat- Penicillin- Agar	25	72	$10^{-1} - 10^{-2}$	$10^{-2} - 10^{-4}$
Thermo- dure Keime	Hefeextrakt- Trypton- Glukose-Agar	30	72 nach vorher. Erhitzung (62,3° C/ 30 Min.)	--	10^{-3}
Psychro- trophe Keime	Hefeextrakt- Trypton- Glukose-Agar	7	240	$10^{-2} - 10^{-3}$	$10^{-3} - 10^{-4}$

Die zu untersuchende Milch wurde in Zehnerstufen (s. Tab. 2) verdünnt und in einer Menge von 1,0 ml in sterile Petrischalen pipettiert. Mit einer sterilen automatischen Spritze wurden 7,0 ml des für die jeweilige Keimgruppe in Betracht kommenden Nährmediums in diese Petrischalen verbracht und unter Kreisbewegungen mit den Milchverdünnungen sorgfältig gemischt. Zur Vermeidung des Wachstums

von sogenannten Fließkolonien, die sich sowohl auf dem Nährmedium als auch zwischen diesem und dem Petrischalenboden ausbreiten können, erfolgte nach dem Erstarren bei Zimmertemperatur eine Über- und Unterschichtung mit jeweils 4,0 ml Nährmedium. Bei diesem Platten-gußverfahren war darauf zu achten, daß keine Lufteinschlüsse im Nährboden das Zählergebnis mit dem Computer-Bild-Analysator verfälschen würden.

3.2.2.2. Prinzip der Arbeitsweise des Quantimet 720 (53)

Das Prinzip des Quantimet 720 wird in der folgenden Abbildung 12 veranschaulicht:



PRINZIP EINER COMPUTER - BILDANALYSE
(QUANTIMET 720)

Abbildung 12

Von einer vorbehandelten (siehe Kapitel 3.2.1.2.) Kulturplatte wird mit einem Epidiaskop ein Bild entworfen. Dieses gelangt über eine Kamera zu einem Bildabtaster, der - dem Auge vergleichbar - das Bild der Petrischale ohne Zeilensprung in 720 Zeilen mit einem Kathodenstrahl abtastet, und zwar 10,8 bis 21 mal innerhalb einer Sekunde. Hierbei wird das Zählfeld der Petrischale in ca. 200 000 Bildpunkte zerlegt. Eine automatische Ausleuchtungskorrektur kompensiert eine ungleichmäßige Helligkeitsempfindlichkeit der Aufnahmeröhre und eine ungleichmäßige Ausleuchtung der Kulturplatte, so daß ein bestimmter Grauton über das gesamte Meßfeld gleichmäßig erkennbar ist.

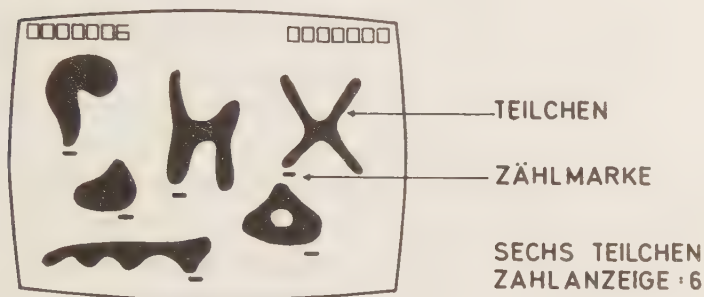
Die Ausgangssignale des Bildabtasters gelangen in den Detektor, der die Objektmerkmale entsprechend ihren Grautönen trennt, z. B. schwarze Partikel zwischen weißen Kolonien (siehe auch Kapitel 3.2.1.5.). Das ist der eigentliche Meßvorgang. Gleichzeitig ermöglicht der Detektor eine Korrektur der Auflösung, so daß z. B. Kratzer auf den Petrischalenböden oder Lufteinschlüsse im Nährmedium mitgezählt oder unterdrückt werden können, sofern sie sich in der Größe von den Kolonien unterscheiden. Auf diese Weise kann der beste Kompromiß zwischen der Auflösung und der Erkennung von Grautönen erreicht werden. Durch ein Speichersystem werden Mehrfachzählungen der gleichen Kolonie verhindert. Die Einstellung einer Untergrundschwelle erlaubt es, den Einfluß einer wechselnden Helligkeit des Untergrundes auf ein Minimum zu reduzieren, wenn z. B. sehr dünne Teilchen von einem unebenen Untergrund zu unterscheiden sind.

Vom Detektor werden die Impulse zum Kompensator weitergeleitet, der es gestattet, die Erkennung eines Teilchens zu unterdrücken oder das Bild zu verbessern. So können Teilchen, die dicht beieinander liegen, als ein Teilchen dargestellt werden, dessen äußere Kanten die Umhüllende aller Teilchen des ausgewählten Teilchenhaufens bilden.

Die Signale laufen weiter zum Rechner, der die Teilchen entsprechend der eingestellten Größenordnung zählt.

Die Zählung von Partikeln kann auf zwei Arten erfolgen:

1. Zählung von Partikeln als Einzelmerkmale (s. Abb. 13)

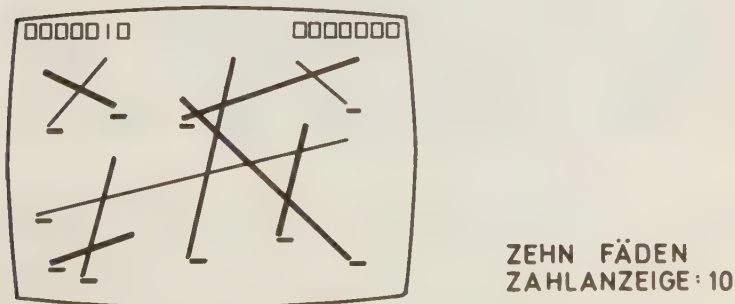


ZÄHLUNG VON PARTIKELN
ALS EINZELMERKMALE

Abbildung 13

Unabhängig von ihrer Form werden Partikel stets richtig gezählt. Einige sehr unregelmäßige Teilchen haben eine tote Zone, in der andere Teilchen nicht gezählt werden. Dies ist aber auf dem Sichtgerät des Rechners zu erkennen und führt selten zu Fehlmessungen.

2. Zählung von Partikeln als Endzählung (s. Abb. 14)

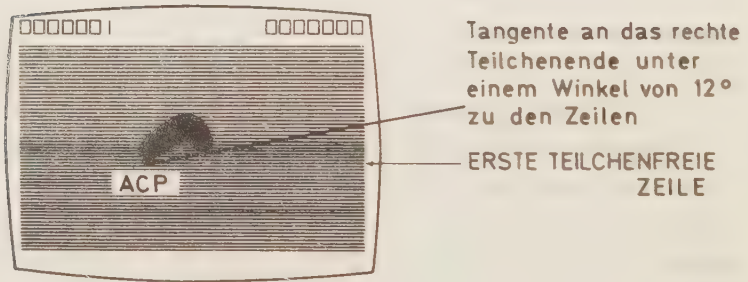


ZÄHLUNG VON PARTIKELN ALS ENDZÄHLUNG

Abbildung 14

Sich überlagernde Partikel, wie z.B. Fäden, werden getrennt gezählt. Es gibt keine toten Zonen; es werden jedoch komplizierte, nicht gleichförmig gekrümmte Partikel öfter als einmal gezählt.

Bei der Zählung als Einzelmerkmal wird ein ausgewähltes Teilchen immer nur an seinem Anti-Coinzidenz-Punkt (ACP) gezählt (s. Abb. 15). Als ACP bezeichnet man den Punkt, der am Schnittpunkt der ersten impulsfreien Zeile unmittelbar unterhalb des Teilchens mit der Tangente liegt, die das Teilchen an der rechten Seite unter einem Winkel von ca. 12° berührt. (5 Bildpunkte nach rechts).



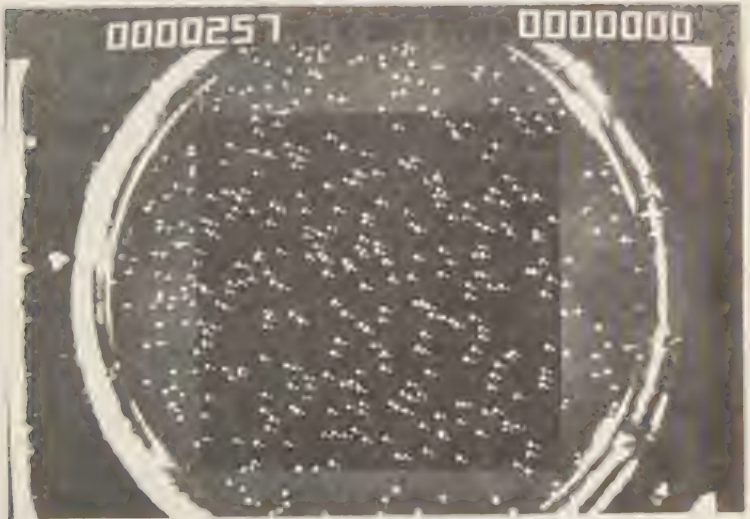
DARSTELLUNG DES ANTI-COINCIDENZ-PUNKTES

Abbildung 15

Die Zählung erfolgt nur, wenn der ACP innerhalb des Standard-Meßfeldes liegt. Auch komplizierte Formen bewirken keine Unterbrechung des Zählvorganges. Die ACP's können ein- und ausgeblendet werden, so daß es dem Operator möglich ist, die auszuzählenden Teilchen zu erkennen.

Alle Ergebnisse können entweder als Mittelwert von 16 Zählungen oder als kontinuierliche Anzeige wiedergegeben werden. Bei Mittelung der Ergebnisse über 16 Messungen erfolgt die Anzeige zwar langsamer, aber genauer. Über einen Akkumulator sind die Ergebnisse addierbar.

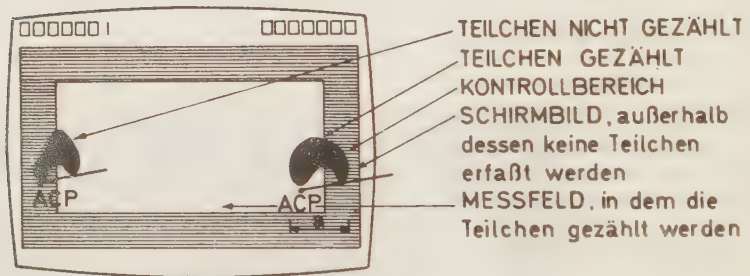
Meßbereich und Meßablauf können über ein Sichtgerät (s. Abb. 16) nach dem Prinzip eines Fernsehschirmes beobachtet werden. Der Monitor enthält zwei Grundkomponenten: Die Anzeige des Bildes und den Signalmischer. Das Bild wird aus 720 Linien aufgebaut und erscheint auf einem orangefarbenen Schirm. Der Mischer enthält fünf Eingangssignale, jedes mit einem unabhängigen Kontrastregler zur Anzeigefolge der Bilder: Ausgewähltes Signal, Rechner, numerische Resultate, die am oberen Bildschirmrand erscheinen, vertikale und horizontale Skalen und Kontrollbereich. Ein Umschalt-Taster bietet dem Benützer die Möglichkeit, schnell zwischen Original- und Signal-Auswahlbild zu wählen. Zusammen mit getrennten Kontrastreglern für beide Signale gestattet dieses eine optimale Einstellung der Grauwerte.



BILDSCHIRMAUFNAHME EINER KULTURPLATTE (Computer-Bild-Analyse)
(dunkel markiertes Meßfeld)

Abbildung 16

Der Bildschirm stellt eine innere viereckige Maske - das Standard-Meßfeld - dar, das von dem Kontrollbereich umgeben ist. Beide Felder sind aus insgesamt 650 000 Einzelpunkten gebildet. Der Rechner kann seine Messungen in den Kontrollbereich hinein ausdehnen und so Partikel, die über das Meßfeld hinausragen, ebenfalls erfassen. Jedoch werden nur Partikel gezählt, deren ACP innerhalb des Standardmeßfeldes liegt (s. Abb. 17). Dieses läßt sich in seiner Größe beliebig verändern und verlagern.



DARSTELLUNG VON STANDARDMESSFELD
UND KONTROLLBEREICH

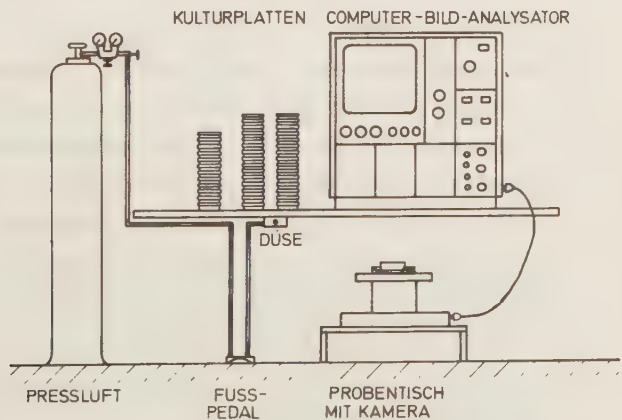
Abbildung 17

Wahlweise oder zusätzlich können die Ergebnisse in ein Datenverarbeitungsgerät weitergeleitet werden. Mit diesem letzten Schritt ist eine vollautomatische Auswertung möglich.

3.2.2.3. Bedienung der Zähleinrichtung

Der Probentisch besteht aus zwei übereinanderliegenden Glasplatten, in deren Mitte sich jeweils eine kreisrunde Öffnung befindet. Die Öffnung der unteren Glasplatte ist gerade so weit, daß ihr Rand die Kante des Kulturplattenbodens trägt, während die obere Glasplatte mit dem wenig größeren Durchmesser ihrer Aussparung ein Verrutschen der Petrischale verhindert. Der Brennpunkt der Kamera wird mit deren Objektiv auf den Petrischalenboden eingestellt. Dieser wird vom Objektiv der Kamera nun nur noch durch eine Luftsäule getrennt.

Da der Computer-Bild-Analysator für diese Untersuchungen so geeicht ist, daß alle Partikel mit mehr als $122\ \mu$ Durchmesser gezählt werden, ist es notwendig, die auf dem Boden der Kulturplatte festhaftenden und die Zählung störenden Staubpartikel zu entfernen. Eine vollständige und schnelle Staubpartikelentfernung gelingt auf einfache Weise mit Hilfe eines Luftstromes, der unter hohem Druck und schrägem Winkel gegen den Petrischalenboden gepreßt wird. Die dazu entwickelte Vorrichtung wird in der Abbildung 18 dargestellt.



SCHEMATISCHER AUFBAU DER ZÄHLEINRICHTUNG

Abbildung 18

Dem vor den Kulturplattenstapeln sitzenden Operator ist es möglich, über einen druckfesten PVC-Schlauch durch Bedienung eines Fußpedals die Verbindung zwischen Preßluftflasche und Düse herzustellen. Die mit der linken Hand vom Stapel genommene Kulturplatte wird entdeckt, mit der rechten Hand ca. 2 Sekunden lang gegen den während der Fußpedalbedienung aus der Düse strömenden Luftstrahl gehalten und anschließend auf den Probenstisch verbracht. Das auf dem Fernsehschirm erscheinende Ergebnis wird nach Verdoppelung der Werte (siehe Kapitel 3.2.2.4.) entweder protokolliert oder gelangt automatisch in ein Datenverarbeitungsgerät.

3.2.2.4. Eichung und Einstellung des Gerätes

Eichung

Der Computer-Bild-Analysator ist grundsätzlich in Bildpunkten geeicht. Alle Klassifizierungsschritte werden ziffernmäßig in horizontalen Bildpunkten erfaßt. Der Meßfeld-Einschub erlaubt, die Größe des Bildes sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Richtung zu verändern. Auch die Lage des Bildes kann kontinuierlich in Bildpunkten bewegt werden.

Um die absolute Meßfeld- und Teilchengröße zu erhalten, muß man die Größe der Bildpunkte kennen, die von dem verwendeten Objektiv der Kamera abhängt. Für alle durchgeführten Untersuchungen wurde ein relativ schwach vergrößerndes Objekt ($f = 25 \text{ mm}$) benutzt, um einen möglichst großen Kulturplattenausschnitt zu erhalten. Zur Bestimmung der Bildpunktgröße ist es notwendig, ein Längenmaß mit Millimeter-einteilung auf den Bildschirm zu projizieren und sein Bild mit der Skala zu vergleichen, die durch den Meßfeld-Einschub auf dem Schirm eingeblendet wird. Mit dem oben angegebenen Objektiv wurde eine Bildpunktgröße von 122μ erreicht.

Meßfeldeinstellung

An Hand der Bestimmung der Bildpunktgröße ist es möglich, ein beliebiges Meßfeld einzustellen. Da die Seiten eines Meßfeldes aber nur in ihrer ganzen Länge zu verändern sind, ist immer nur ein viereckiges Meßfeld erhältlich. Dadurch ergaben sich Schwierigkeiten in der Meßfeldeinstellung einer

Kulturplatte. Das Problem wurde gelöst, indem das Meßfeld exakt auf die Hälfte der inneren Petrischalenfläche eingestellt und das Zählergebnis verdoppelt wurde. Dazu war zunächst einmal die Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes der Innenfläche einer größeren Anzahl von Petrischalen notwendig. Nach Berechnung des mittleren Durchmessers und der mittleren Wandstärke von 100 Petrischalen ergab sich für die Innenfläche ein Mittelwert von $56,850 \text{ cm}^2$. Die Differenz des Innenflächenmittelwertes zwischen der kleinsten und größten Petrischale betrug $1,070 \text{ cm}^2$. Somit lag nach dieser Berechnung die Aufgabe darin, die Fläche von $28,425 \text{ cm}^2$ in Bildpunkten auszudrücken. Da ein Bildpunkt den Durchmesser von 122μ besitzt, ergibt sich für die Fläche von $28,425 \text{ cm}^2$ eine Zahl von 190 977 Bildpunkten, die im Quadrat dargestellt eine Seitenzahl von jeweils 437 Bildpunkten ergeben mit einem Rest von 8 Bildpunkten ($0,199 \text{ mm}^2$), der nicht berücksichtigt wurde.

Grauwerteinstellung

Wie im Kapitel 3.2.2.2. erwähnt, gibt der Computer-Bild-Analysator dem Benutzer die Möglichkeit, innerhalb des Gesichtsfeldes Objektmerkmale auszuwählen und sie von anderen zu trennen. Diese Auswahl ist nur möglich, wenn die Objektmerkmale sich in ihren Grauwerten unterscheiden, z. B. in Farbe, Kontrast etc. Der Detektor enthält drei voneinander unabhängige Grauwert-Diskriminatoren, von denen jeder auf einen beliebigen Wert der Grauskala zwischen weiß und schwarz eingestellt werden kann. Auf diese Weise sind vier verschiedene Grauwertbereiche vorwählbar; die Zahl kann durch Parallelschalten mehrerer Detektoren erhöht werden.

Die Art der Einstellung des Grauwertpegels unterliegt der optischen Kontrolle, d. h. alle zu zählenden Kolonien verschiedener Größe müssen an ihrem unteren Ende den Zählpunkt (ACP) aufweisen. Bei einer Kulturplatte mit sehr kleinen und großen Kolonien ist es daher erforderlich, die Grauwert-Diskriminatoren von ihrer höchsten Empfindlichkeit an beginnend langsam herunterzudrehen. Um festzustellen, welche Spanne die Einstellung der Grauwert-Diskriminatoren auf ein gleichbleibendes Zählergebnis aufweist, wurden einige Kulturplatten (Hefeextrakt-Trypton-Glukose-Agar) mit Kolonien unterschiedlicher Größe in Abhängigkeit der Einstellung der Grauwert-Diskriminatoren auf das Zählergebnis hin untersucht. Die fort-

laufende Veränderung der Grauwert-Diskriminatoren um jeweils einen kleinen Teilstrich und die Zählergebnisse wurden registriert und in einem Ordinatensystem eingetragen. Die Abbildung 19 zeigt die Kurven von sechs Untersuchungen, wobei deutlich wird, daß sich zwischen Grauwert-Einstellung und Zählergebnis ein Plateau ausbildet. Veränderungen der Grauwert-Einstellung in einem bestimmten Bereich - in diesem Falle zwischen 0,40 und 1,20 (entsprechend 80 Teilstriche) - führen lediglich zu unwesentlichen Abweichungen der Zählergebnisse. Die Zählung wird in diesem Plateau durchgeführt.

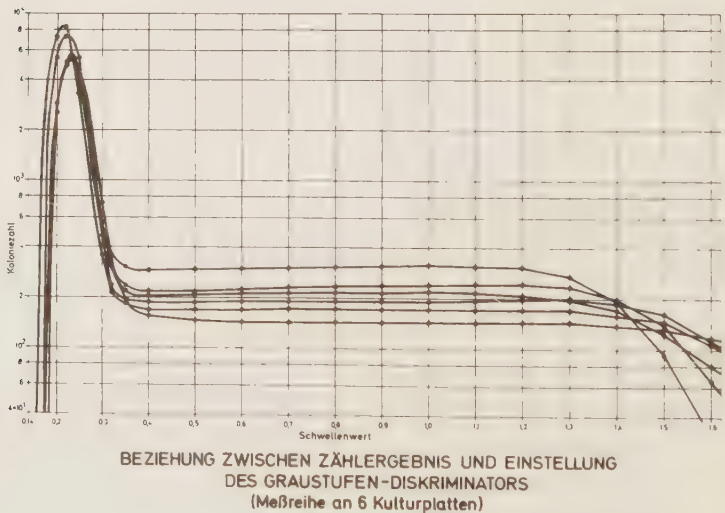


Abbildung 19

3.2.2.5. Durchführung der Plattenzählung zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Alle Milchproben wurden zweimal unabhängig voneinander angesetzt und nach der Inkubation auf den entsprechenden Verdünnungsplatten (siehe Kapitel 3.2.2.1.) von derselben erfahrenen Person ausgezählt. Dazu diente folgende Vorrichtung: Eine mit Makrokolonien bewachsene Kulturplatte wird mit ihrer Oberseite auf eine erleuchtete Unterlage verbracht und mit Hilfe einer Lupe vergrößert. Die zählende Person markiert auf den Petrischalenböden die Kolonien der gesamten Kulturplattenfläche, wodurch gleichzeitig ein Zählimpuls gesetzt wird. Das Zählergebnis kann anschließend direkt abgelesen werden.

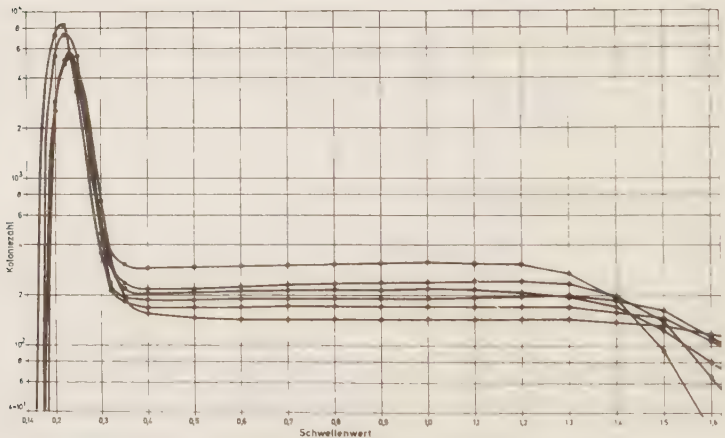
Kulturplatte. Das Problem wurde gelöst, indem das Meßfeld exakt auf die Hälfte der inneren Petrischalenfläche eingestellt und das Zählergebnis verdoppelt wurde. Dazu war zunächst einmal die Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes der Innenfläche einer größeren Anzahl von Petrischalen notwendig. Nach Berechnung des mittleren Durchmessers und der mittleren Wandstärke von 100 Petrischalen ergab sich für die Innenfläche ein Mittelwert von $56,850 \text{ cm}^2$. Die Differenz des Innenflächenmittelwertes zwischen der kleinsten und größten Petrischale betrug $1,070 \text{ cm}^2$. Somit lag nach dieser Berechnung die Aufgabe darin, die Fläche von $28,425 \text{ cm}^2$ in Bildpunkten auszudrücken. Da ein Bildpunkt den Durchmesser von 122μ besitzt, ergibt sich für die Fläche von $28,425 \text{ cm}^2$ eine Zahl von 190 977 Bildpunkten, die im Quadrat dargestellt eine Seitenzahl von jeweils 437 Bildpunkten ergeben mit einem Rest von 8 Bildpunkten ($0,199 \text{ mm}^2$), der nicht berücksichtigt wurde.

Grauwerteinstellung

Wie im Kapitel 3.2.2.2. erwähnt, gibt der Computer-Bild-Analysator dem Benutzer die Möglichkeit, innerhalb des Gesichtsfeldes Objektmerkmale auszuwählen und sie von anderen zu trennen. Diese Auswahl ist nur möglich, wenn die Objektmerkmale sich in ihren Grauwerten unterscheiden, z. B. in Farbe, Kontrast etc. Der Detektor enthält drei voneinander unabhängige Grauwert-Diskriminatoren, von denen jeder auf einen beliebigen Wert der Grauskala zwischen weiß und schwarz eingestellt werden kann. Auf diese Weise sind vier verschiedene Grauwertbereiche vorwählbar; die Zahl kann durch Parallelschalten mehrerer Detektoren erhöht werden.

Die Art der Einstellung des Grauwertpegels unterliegt der optischen Kontrolle, d. h. alle zu zählenden Kolonien verschiedener Größe müssen an ihrem unteren Ende den Zählpunkt (ACP) aufweisen. Bei einer Kulturplatte mit sehr kleinen und großen Kolonien ist es daher erforderlich, die Grauwert-Diskriminatoren von ihrer höchsten Empfindlichkeit an beginnend langsam herunterzudrehen. Um festzustellen, welche Spanne die Einstellung der Grauwert-Diskriminatoren auf ein gleichbleibendes Zählergebnis aufweist, wurden einige Kulturplatten (Hefeextrakt-Trypton-Glukose-Agar) mit Kolonien unterschiedlicher Größe in Abhängigkeit der Einstellung der Grauwert-Diskriminatoren auf das Zählergebnis hin untersucht. Die fort-

laufende Veränderung der Grauwert-Diskriminatoren um jeweils einen kleinen Teilstrich und die Zählergebnisse wurden registriert und in einem Ordinatensystem eingetragen. Die Abbildung 19 zeigt die Kurven von sechs Untersuchungen, wobei deutlich wird, daß sich zwischen Grauwert-Einstellung und Zählergebnis ein Plateau ausbildet. Veränderungen der Grauwert-Einstellung in einem bestimmten Bereich - in diesem Falle zwischen 0,40 und 1,20 (entsprechend 80 Teilstriche) - führen lediglich zu unwesentlichen Abweichungen der Zählergebnisse. Die Zählung wird in diesem Plateau durchgeführt.



BEZIEHUNG ZWISCHEN ZÄHLERGEBNIS UND EINSTELLUNG
DES GRAUSTUFEN-DISKRIMINATORS
(Meßreihe an 6 Kulturplatten)

Abbildung 19

3.2.2.5. Durchführung der Plattenzählung zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Alle Milchproben wurden zweimal unabhängig voneinander angesetzt und nach der Inkubation auf den entsprechenden Verdünnungsplatten (siehe Kapitel 3.2.2.1.) von derselben erfahrenen Person ausgezählt. Dazu diente folgende Vorrichtung: Eine mit Makrokolonien bewachsene Kulturplatte wird mit ihrer Oberseite auf eine erleuchtete Unterlage verbracht und mit Hilfe einer Lupe vergrößert. Die zählende Person markiert auf den Petrischalenböden die Kolonien der gesamten Kulturplattenfläche, wodurch gleichzeitig ein Zählimpuls gesetzt wird. Das Zählergebnis kann anschließend direkt abgelesen werden.

Dieselben Petrischalen wurden daraufhin von den Markierungspunkten gesäubert und ihre Koloniezahl unter Verwendung des Computer-Bild-Ansalyators bestimmt. Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl nahm der Drehknopf für die Polarität die untere Stellung ein, so daß damit alle Teilchen erfaßt wurden, die einen helleren Grauton als der Untergrund aufwiesen. Der Pegelknopf wurde auf Stufe 1 gestellt, den Bereich zwischen Grauwert-Pegel A und weiß. Die Einstellung des Grautones erfolgte mit Hilfe des Schwellenwert-Pegels A.

Da das Meßfeld dieses Gerätes auf die halbe Kulturplattenfläche eingestellt ist, mußte die Homogenität der Kolonieverteilung sowohl für die Gesamtkeimzahl-Bestimmung als auch für die Selektivzählung der einzelnen Keimgruppen untersucht werden. Dies geschah durch jeweils drei Zählungen der beiden Ansätze, indem die Kulturplatte für jede Koloniezahlbestimmung durch Verstellen des Epidiaskops eine andere Position einnahm.

3.2.2.6. Selektive Erfassung bestimmter Keimgruppen

Die selektive Erfassung von coliformen Keimen, Streptokokken, Enterokokken, Pseudomonaden, thermotoleranten und psychrotrophen Keimen erfolgte in gleicher Weise wie die Bestimmung der Gesamtkeimzahl.

3.2.3. Konventionelle Milchuntersuchungsmethoden

3.2.3.1. Messung des Redoxpotentials

Zur Messung des Redoxpotentials wurde die Resazurinprobe herangezogen. Dazu wurden in einem Reagenzglasröhrchen 10 ml Milch mit 1 ml einer den Standardvorschriften entsprechenden frisch hergestellten Resazurinlösung gründlich durchmischt. Sofort nach dem Ansetzen wurden die Proben in ein Wasserbad von 37⁰ C verbracht. An Hand von Farbtafeln wurde nach einer Stunde der Farbton gemessen und die Milch danach in Güteklasse I bis III eingestuft (siehe Kapitel 2.1.2.3.1.).

3.2.3.2. Messung der Eiweißstabilität mit Hilfe von Alkohol

Zur Messung der Eiweißstabilität wurden die einfache, doppelte und dreifache Alkoholprobe (1 Raumteil Milch plus 1 bzw. 2 bzw. 3 Raumteile 68 vol%iger Alkohol) durchgeführt. Mit Erhöhung des Alkoholanteils sollte eine größere Empfindlichkeit dieser Methode erzielt werden. In Reagenzglasröhrchen wurde 1 ml Milch mit dem entsprechenden Raumanteil Alkohol vermischt und nach ca. 1 Minute unter zweimaligem leichten Umschwenken der Röhrchen der Ausflockungsgrad der Milch gegen eine schwarze Unterlage bestimmt (siehe Kapitel 2.1.2.3.2.).

3.2.3.3. Messung des pH-Wertes

Zur Bestimmung des aktuellen Säuregrades wurde die elektrometrische pH-Wert-Messung mit Hilfe einer Glaselektrode durchgeführt (siehe Kapitel 2.1.2.3.2.).

3.2.3.4. Sensorische Prüfung

Zur Wahrnehmung von Geruchs- und Geschmacksabweichungen in der Milch wurden die mit ca. 10 ml Milch gefüllten Reagenzglasröhrchen verschlossen und ca. 20 Minuten bei 37⁰ C in einem Wasserbad aufbewahrt. Unmittelbar nach Herausnahme der Proben wurde die Milch in ein 50-ml-Becherglas geschüttet und daraus die Geruchs- und Geschmacksprobe vorgenommen. Für diese Untersuchungen waren während der gesamten Versuchsdauer dieselben Personen zuständig. Bewertet wurden die Milchproben nach den gesetzlichen Bestimmungen entsprechenden Wertmalen (16) und zwar

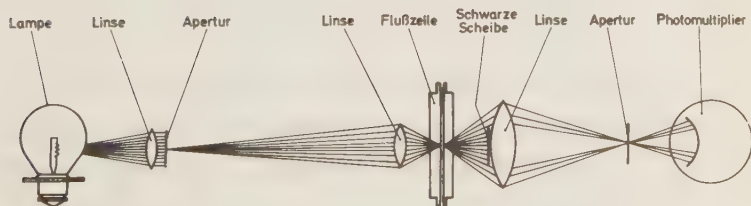
G e r u c h		G e s c h m a c k	
sehr gut	3 Wertmale	sehr gut	10 Wertmale
gut	2 Wertmale	gut	9 Wertmale
fehlerhaft	1 Wertmal	leicht fehlerhaft	8 Wertmale
stark fehlerhaft	0 Wertmale	fehlerhaft	7 - 6 Wertmale
		stark fehlerhaft	unter 6 Wertmale

3.2.4. Bestimmung der Anzahl somatischer Zellen in der kontinuierlichen Durchflußanalyse

3.2.4.1. Prinzip

Für die Ermittlung des von Mikroorganismen in der Milch hervorgerufenen Pyruvat-Gehaltes ist es erforderlich festzustellen, ob und in welchem Umfange solcher auch von in der Milch vorhandenen somatischen Zellen produziert wird. Aus diesem Grunde mußte in Relation zum Pyruvatgehalt auch die Anzahl dieser Zellen in der Milch bestimmt werden. Neben der schon bekannten elektronischen Methode mit dem Coulter-Counter-Gerät wurde für diese umfangreichen Untersuchungen eine vollautomatische Bestimmung mit Hilfe des Auto-Analyzer-Systems II entwickelt (64, 65, 66, 67).

Das Prinzip basiert auf der Grundlage aller Auto-Analyzer-Methoden (siehe auch Kapitel 3.2.1.). Die Veränderungen dazu bestehen lediglich in dem Austausch eines Bausteines (Colorimeter bzw. Fluorometer) gegen ein Zellzählgerät. Dieses arbeitet nach einem optischen System und wird in Abbildung 20 dargestellt:



SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SOMATIC-CELL-COUNTING PRINZIPS

Ein von einer weißglühenden Lampe erzeugter Lichtstrahl durchläuft ein Linsensystem und wird in der Mitte einer Flußzelle, die von den einzelnen Proben durchlaufen wird, fokussiert. Befindet sich kein Partikel in dieser Flußzelle, so fällt dieser Lichtstrahl unabgelenkt auf eine hinter der Flußzelle befindliche schwarze Scheibe und wird absorbiert. Bei Vorhandensein eines Teilchens wird der Lichtstrahl an diesem zerstreut und gelangt somit über ein weiteres Linsensystem auf einen Photomultiplier, in dem ein elektrischer Impuls erzeugt wird. Die Anzahl der Stromstöße ist proportional der Konzentration der Teilchen, die in einer bestimmten Zeit die Flußzelle durchlaufen. Durch einen Schwellenwertschalter können Störimpulse eliminiert werden. Die Impulse werden verstärkt und als "Millivolt" auf den Recorder übertragen.

3.2.4.2. Vorbehandlung der Milchproben (67)

Zur Fixation der Milchzellen, zur Verhinderung von Keimwachstum und zur Kenntlichmachung der Proben wird die Milch mit einer gefärbten Stabilisierungsflüssigkeit folgender Zusammensetzung behandelt:

10,0 ml Formaldehyd solutus 35%ig (Formalin) p. a.

0,02 g Eosin wasserlöslich

Aqua dest. ad 100,0 ml

Die Stabilisierungsflüssigkeit wird partikelfrei filtriert.

Für ca. 10 ml Milch werden 0,2 ml dieser Stabilisierungsflüssigkeit in die Probenfläschchen vorgegeben. Hierzu eignet sich eine automatische Pipettierspritze.

Nach gründlichem Durchmischen muß das Formalin etwa 24 Stunden bei Zimmertemperatur auf die Milch einwirken. Danach können die Proben maximal 72 Stunden bis zur weiteren Verarbeitung bei Kühlschranktemperatur gelagert werden.

Eine Schnellfixation ist möglich, wenn es sich um sehr frische, nur geringgradig verkeimte Proben handelt. An Stelle der 24-stündigen Aufbewahrung bei Zimmertemperatur genügt die Erhitzung der Proben für 45 bis 60 Minuten auf 55° C im Wasserbad.

3.2.4.3. Kurzbeschreibung (Flußdiagramm im Auto-Analyzer-System II s. Abb. 21)

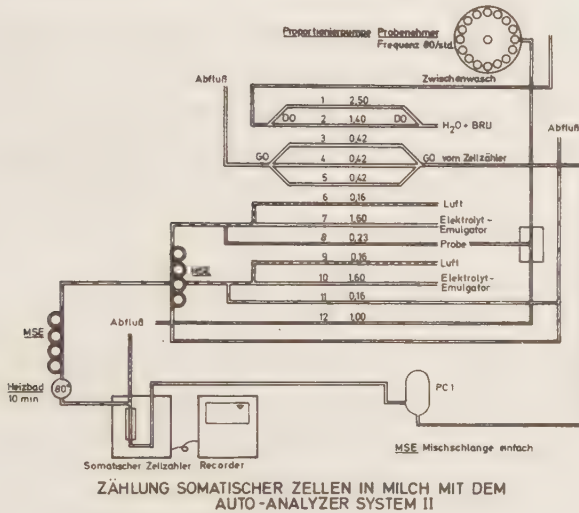


Abbildung 21

0,23 ml der vorbehandelten Milchprobe werden mit 1,60 ml Elektrolyt-Emulgator-Gemisch verdünnt und mit 0,16 ml Luft segmentiert. Nach gründlichem Durchmischen werden hiervon 0,16 ml wiederum mit 1,60 ml Elektrolyt-Emulgator-Gemisch verdünnt und mit 0,16 ml Luft segmentiert, so daß eine Endverdünnung von 1 : 88 erreicht ist. Nach abermaliger Durchmischung erfolgt die Lösung des Fettes bei einer Verweildauer von 10 Minuten in einem 80° C-Heizbad. Danach findet die Zellzählung in dem "Somatic Cell Counter" statt.

3.2.4.4. Reagenzien

Präparation des Emulgator-Elektrolyt-Gemisches

Das Gemisch besteht aus

- 84,5 Vol% physiologischer Kochsalzlösung (0,9%ig)
- 12,5 Vol% Äthanol (96%ig)
- 1,0 Vol% Formaldehyd solutus (35%ig) p. a.
- 2,0 Vol% Triton-X-100 (Octylphenoldekaäthylenglykoläther)

Präparation des Milchzellenstandards

1. Milch mit hohem Zellgehalt zentrifugieren
(10 Minuten bei 2000 U/min.)
2. Bodensatz in 1%iger Formalinlösung (1 Teil 35%iges Formalin
+ 34 Teile physiologische NaCl-Lösung, partikelfrei zentrifugiert)
aufschwemmen und zentrifugieren
(10 Minuten bei 2000 U/min.)
3. Bodensatz im Elektrolyt-Emulgator-Gemisch aufschwemmen
und zentrifugieren
(10 Minuten bei 2000 U/min.)
4. Bodensatz ca. 12 Stunden in 1%iger Formalinlösung bei Kühlschrank-
temperatur stehen lassen
5. Bodensatz wiedergewinnen durch Zentrifugieren
(10 Minuten bei 2000 U/min.)
6. Bodensatz in 1%iger Formalinlösung aufschwemmen, elektronisch
zählen (Coulter-Counter) und auf 1,5 Millionen Zellen/ml mit 1%iger
Formalinlösung einstellen
Aufbewahrung bei Kühlschranktemperatur

3.2.4.5. Sicherheit

Aus dem vorliegenden Material betrug der Korrelationskoeffizient zwischen der elektronischen Zellzählung und derjenigen im Auto-Analyzer-System II $r = 0,92$, während sich zwischen unabhängigen Ansätzen im Auto-Analyzer-System ein solcher von $r = 0,98$ ergab.

3. 2. 5. Erfassung und Verarbeitung der Daten

Die Erfassung der Probeninformationen und Labordaten erfolgte auf abloCHFähigen Protokollen.

Als einheitliches Prinzip zur späteren Zusammenföhrung der Daten diente die fortlaufende Durchnumerierung der Proben. Nach dem Ablochen wurden alle Informationen auf Magnetbänder einer elektronischen Rechenanlage vom Typ Siemens 4004/35 geladen. In dieser Form stand das gesamte Untersuchungsmaterial jederzeit für den direkten Zugriff der zu bearbeitenden Programme zur Verfügung.

Der durch Stichprobe, Pipettierungsgenauigkeit und Meßwerterfassung entstehende Fehler wurde als Anteil an der Gesamtvariabilität der einzelnen Merkmale in zweistufigen hierarchischen Varianzanalysen errechnet.

Es bedeuten in den Tabellen bzw. im Text

$\bar{X}_G$	geometrischer Mittelwert
$\bar{X}_A$	arithmetischer Mittelwert
s	Streuung
r	Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient

Gemäß der exponentiellen Vermehrungsfähigkeit von Keimen sind die Häufigkeiten von Keimzahlbefunden erst nach logarithmischer Transformation näherungsweise normal verteilt. Dasselbe gilt für Pyruvat als Zwischenprodukt im Stoffwechsel der Mikroorganismen.

Für den Vergleich solcher Verteilungen sind geometrische Mittelwerte wesentlich aussagekräftiger als arithmetische, da bei arithmetischer Betrachtung extrem hohe Werte die Ergebnisse außerordentlich verzerrern können.

3.3. Untersuchungsergebnisse

3.3.1. Pyruvat als zentraler Stoffwechselfparameter des bakteriellen Katabolismus

3.3.1.1. Spezifität der fluorometrischen Pyruvatbestimmung

Zur Prüfung der Spezifität dieser Methode wurden unter identischen Bedingungen in der kontinuierlichen Durchflußanalyse die nach BERGMAYER (49) neben Pyruvat durch LDH umsetzbaren Substanzen geprüft. Zu diesen gehören:

1. β -Hydroxy-Pyruvat
2. Glyoxalat
3. α -Ketobutyrat
4. α -Keto-n-valerat
5. Oxalacetat

Von diesen Substanzen werden β -Hydroxy-Pyruvat und Glyoxalat mit größenordnungsmäßig gleicher Geschwindigkeit, die restlichen drei jedoch wesentlich langsamer umgesetzt. Die α -Keto-Analoga von Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Glutaminsäure und Asparaginsäure werden praktisch nicht umgesetzt (49).

Bei den Untersuchungen im Auto-Analyzer-System wurde festgestellt, daß die Fremdaktivität von LDH in Bezug auf β -Hydroxy-Pyruvat ca. 50 % betrug, während die Enzymwirkung auf die anderen vier Substanzen so minimal war, daß sie für die vorliegenden Untersuchungen nicht in Betracht zu ziehen sind.

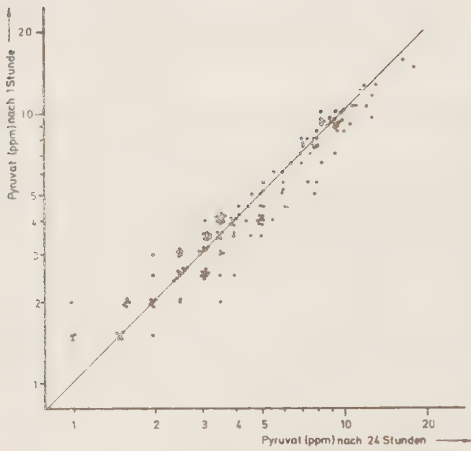
Daraufhin wurden der Pyruvat- und β -Hydroxy-Pyruvat-Gehalt von 100 Milchproben festgestellt und miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurden für die Bestimmungen in der kontinuierlichen Durchflußanalyse lediglich die Enzyme innerhalb der Enzym-Arbeitslösung ausgewechselt. Für die β -Hydroxy-Pyruvat-Analyse wurde 1,0 ml Glycerat-Dehydrogenase aus Spinat (BOEHRINGER) in einer Konzentration, die der der LDH entspricht, nämlich 5 mg/ml, zugeführt. Dieses Enzym setzt auch Glyoxalat um. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist mit diesem Substrat jedoch

vier bis fünf mal geringer als mit β -Hydroxy-Pyruvat. Pyruvat wird nicht umgesetzt.

Während die Pyruvat-Werte zwischen 1 und 20 ppm schwankten, lag der höchste β -Hydroxy-Pyruvat-Gehalt bei 2,5 ppm. Dies bedeutet, daß nur relativ geringe Mengen dieser Substanz in Milch vorhanden sind und somit die Pyruvat-Ergebnisse kaum beeinträchtigt werden. Mit der gleichzeitigen Erfassung von β -Hydroxy-Pyruvat wird die Spezifität dieser Methode auch deshalb nicht eingeschränkt, da β -Hydroxy-Pyruvat als Abbauprodukt der Aminosäure Serin in den Endabbauweg der Glykolyse eingeht und damit schließlich ebenfalls zu Pyruvat abgebaut wird.

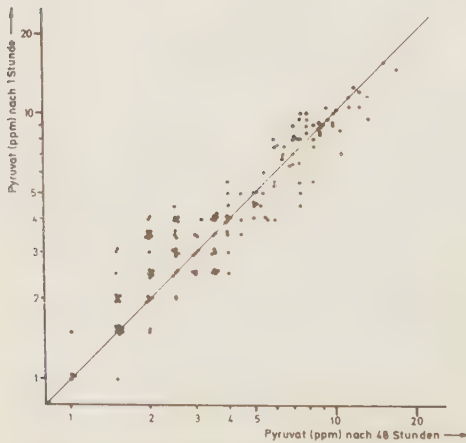
3.3.1.2. Konservierung von Milchproben

Eine wirksame Konservierung der Proben ist eine wesentliche Voraussetzung für die Praktikabilität eines Untersuchungsverfahrens. Zur Prüfung der Frage, ob eine Stabilisierung des Pyruvat-Pools in der Milch möglich ist, wurde als Konservierungsmittel Formalin herangezogen und zwar in der Konzentration, die auch für die Fixierung somatischer Zellen zur Zählung im elektronischen Partikelzähler oder in der kontinuierlichen Durchflußanalyse verwendet wird. Für die Untersuchung standen 163 bzw. 160 Proben roher Sammelmilch zur Verfügung. In Reagenzglasröhrchen wurden jeweils 10 ml Milch mit 0,2 ml 3,5 vol. %igem Formalin vermischt und in einer Zeitreihe von 5 Tagen bei Zimmertemperatur täglich der Pyruvatgehalt ermittelt. Als Bezugswert galt der eine Stunde nach Formalinzugabe bestimmte Pyruvat-Gehalt.



Vergleich des Pyruvatgehaltes von 163 konservierten
Sammelmilchen (0,2 ml 3,5%iges Formalin plus 10 ml Milch)
nach 1- und 24-stündiger Aufbewahrung bei 20°C

Abbildung 22



Vergleich des Pyruvatgehaltes von 160 konservierten
Sammelmilchen (0,2 ml 3,5%iges Formalin plus 10 ml Milch)
nach 1- und 48-stündiger Aufbewahrung bei 20°C

Abbildung 23

Die graphischen Darstellungen (s. Abb. 22 und 23) machen deutlich, daß die Erhaltung des Pyruvat-Status der Milchproben über einen Zeitraum von 2 Tagen mit hoher Sicherheit möglich ist. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten betragen $r = 0,97$ bei 24-stündiger und $r = 0,94$ bei 48-stündiger Aufbewahrung. Die Übereinstimmung der Pyruvatwerte zwischen dem ersten und zweiten Tag wird durch den Korrelationskoeffizienten von $r = 0,98$ wiedergegeben. Nach Ablauf von 2 Tagen vergrößert sich mit zunehmender Konservierungsdauer die Streuung der ermittelten Werte.

3.3.1.3. Der Pegel des Pyruvat-Pools in Beziehung zu sekretorischen Faktoren

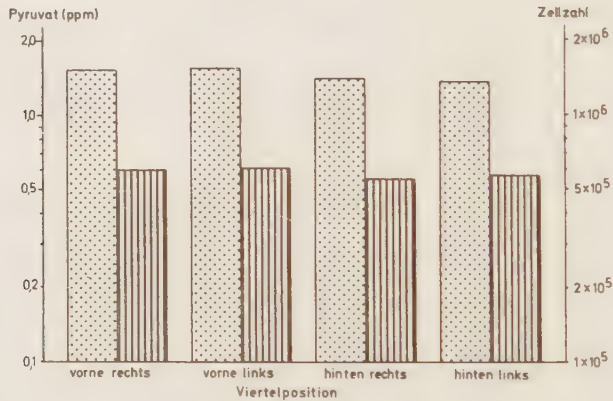
3.3.1.3.1. Pyruvat-Gehalt in steril gewonnener Milch gesunder Versuchstiere

Voraussetzung für die Bestimmung des Pyruvat-Gehaltes in frischer Milch eutergesunder Tiere ist die Möglichkeit, diese Milch aus einer gesunden Milchdrüse zu gewinnen. Dazu standen 19 Versuchstiere zur Verfügung, denen ein Kathetersystem zum sterilen Entzug der Milch implantiert wurde (17). Die Tiere befanden sich in der 1. bzw. 2. Laktation, waren klinisch gesund und in gutem Ernährungszustand. Die Milchleistung betrug mindestens 10 Liter pro Tag. Viertelgemelksproben wurden vor der Katheterimplantation über 4 aufeinander folgende Tage bakteriologisch und quantitativ-zytologisch untersucht. Von den entnommenen Milchproben wurde unmittelbar nach der Gewinnung in zwei unabhängigen Ansätzen der Pyruvat-Gehalt ermittelt.

Aus dieser Untersuchung resultiert, daß der Pyruvat-Gehalt in frischer Milch eutergesunder Tiere zwischen 0,5 und 3 ppm variiert.

3.3.1.3.2. Pyruvat-Gehalt in Viertelgemelksproben aus einem Praxisbezirk in Beziehung zu laktationsphysiologischen und -pathologischen Faktoren

3.3.1.3.2.1. Viertelposition

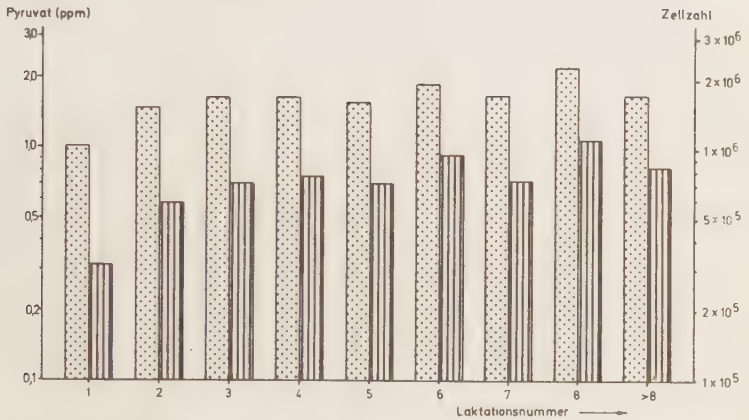


Gegenüberstellung von Pyruvat- und Zellgehalt in Viertelmelken unter Berücksichtigung der Viertelposition (n = 2041)

Abbildung 24

2 041 nach Zitzendesinfektion gewonnene Viertelgemelksproben von 528 Kühen aus 30 Beständen wurden auf ihren Pyruvat-Gehalt hin untersucht und die Ergebnisse zunächst ohne Berücksichtigung der Eutergesundheit ausgewertet. Nach Abbildung 24 liegt der geometrische Pyruvat-Mittelwert aller Viertel unter 2 ppm. Trotz dieses geringen Pyruvat-Gehaltes ist die Anzahl somatischer Zellen in diesen Milchproben erstaunlich hoch, durchweg oberhalb von 500 000/ml. Dabei fällt auf, daß die Milch der beiden hinteren Viertel sowohl einen geringfügig niedrigeren Pyruvat-Spiegel als auch einen entsprechend geringeren Zellgehalt aufweist. Hieraus deutet sich eine gewisse Abhängigkeit der Pyruvat-Werte von der Zellzahl an, die jedoch ihrerseits zum Nachweis von Mastitisserregern korrelieren (siehe Kapitel 3.3.1.3.5.).

3.3.1.3.2. Laktationsnummer

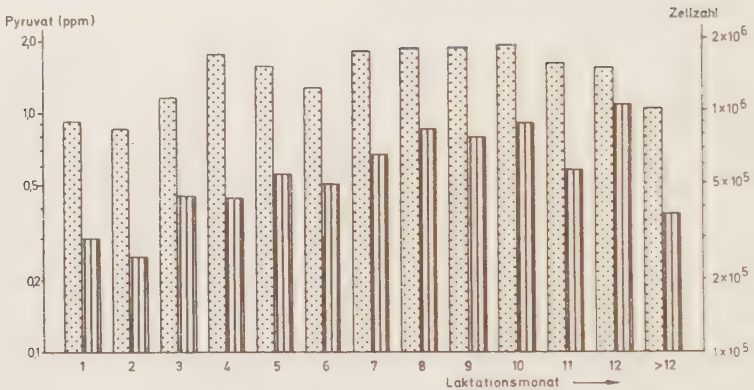


Gegenüberstellung von Pyruvat- und Zellgehalt in Viertelgemelken unter Berücksichtigung der Laktationsnummer (n = 2041)

Abbildung 25

Der Pyruvat-Gehalt in allen 2 041 Viertelgemelksproben weist nur eine geringgradige Variation innerhalb der verschiedenen Laktationsnummern der 528 Kühe auf. Eine Tendenz ist nicht erkennbar. Aus der Abbildung 25 wird ersichtlich, daß zwischen Pyruvat-Gehalt und Anzahl der Laktationen keine Beziehung besteht.

3.3.1.3.2.3. Laktationsstadium



Gegenüberstellung von Pyruvat- und Zellgehalt in Viertelgemelken unter Berücksichtigung des Laktationsmonats (n=2041)

Abbildung 26

Die Abbildung 26 macht deutlich, daß zwar geringgradige Schwankungen im Pyruvat-Gehalt dieser 2 041 Viertelgemelksproben vorhanden sind, eine Beziehung zum Laktationsstadium aber nicht erkennbar ist.

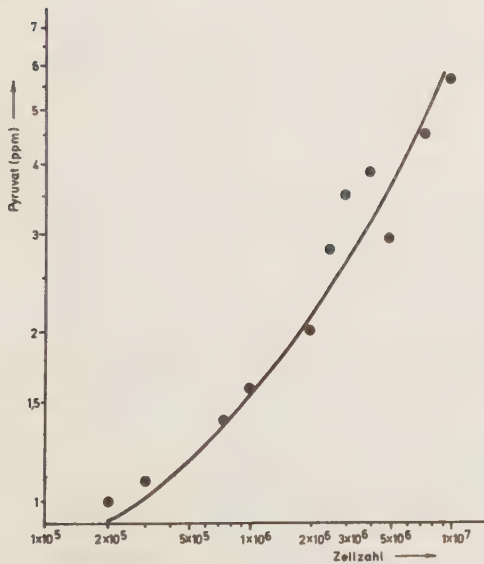
3.3.1.3.2.4. Anzahl somatischer Zellen

Vorversuch:

Zunächst wurde der Einfluß somatischer Zellen auf den Pyruvat-Gehalt in frischer keimarmer Milch von Kühen mit hohem Zellgehalt untersucht. Zu diesem Zweck wurde nach vorausgegangener Bestimmung der Gesamtkeimzahl, die in jedem Viertel unter 100/ml Milch lag, in zwei Vierteln der Euter durch Infusion von jeweils 100 ml physiologischer Kochsalzlösung experimentell eine aseptische Entzündung gesetzt. Etwa 20 Stunden nach dieser Irritation des Parenchyms konnten Zellzahlwerte bis zu 11 Millionen/ml in den behandelten gegenüber 20 000/ml Milch in den unbehandelt gebliebenen Vierteln nachgewiesen werden.

Bis zu einem Zellgehalt von ca. 3 Millionen/ml Milch wurden Pyruvat-Werte unter 3 ppm, d. h. innerhalb des Normalbereichs, gemessen. Es ist zu prüfen, ob darüber hinausgehende Werte als Folge der erhöhten Permeabilität der Blutgefäße, die bei akuten Mastitiden entsteht, auf einen direkten Übertritt von Pyruvat aus dem Blut zurückzuführen sind.

Hauptversuch:



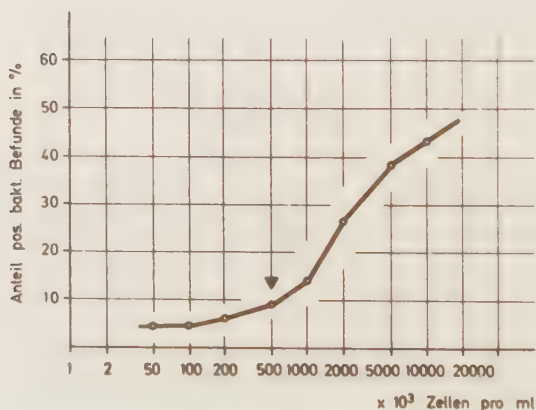
**Beziehungen zwischen Pyruvat- und Zellgehalt
in Viertelgemelken (n = 2041)**

Abbildung 27

Der im Vorversuch ermittelte Grenzwert von ca. 3 Millionen Zellen/ml Milch, unterhalb dessen der Pyruvat-Gehalt < 3 ppm ist, wird durch die Untersuchung von 2 041 Viertelgemelksproben bestätigt (s. Abb. 27). Bei Zellzahlwerten oberhalb 3 Millionen/ml Milch muß mit einem über die Norm hinausgehenden Anstieg des Pyruvat-Gehaltes gerechnet werden. Dieser Anstieg dürfte zu einem großen Teil auf die mikrobielle Aktivität der Mastitiserreger zurückzuführen sein (siehe Kapitel 3. 3. 1. 3. 2. 5.).

3. 3. 1. 3. 2. 5. Bakteriologische Befunde aus der Mastitisiagnostik

Eine Wechselbeziehung zwischen der Höhe der Zellzahl und der prozentualen Häufigkeit positiver bakteriologischer Befunde in Milch ist erwiesen und wird in der Abbildung 28 veranschaulicht (68):



Beziehungen zwischen der Höhe der Zellzahlbefunde von 3 944 Viertelgemelksproben und der prozentualen Häufigkeit positiver bakteriologischer Befunde (n=428)

Abbildung 28
(nach REICHMUTH (68))

Diese Beziehung kann auch durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden: Bei den 1 968 Viertelgemelksproben (s. Tab. 3) zeigt sich die Tendenz eines gleichsinnigen Anstiegs der Zellzahl und der Häufigkeit des Nachweises euterpathogener Streptokokken und Staphylokokken. Trotz des relativ geringen Materials wird die Vermutung untermauert (siehe Kapitel 3.3.1.3.2.4.), daß eine Erhöhung der Pyruvat-Werte bei einer pathologisch erhöhten Anzahl somatischer Zellen auf den Katabolismus der Mastitiserreger zurückzuführen ist.

Tabelle 3

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER HÖHE DER ZELLZAHLBEFUNDE VON 1 968 VIERTELGEMELKSPROBEN UND DER PROZENTUALEN HÄUFIGKEIT POSITIVER BAKTERIOLOGISCHER BEFUNDE (n= 71)		
Zellgehalt in 1000	Anzahl bakteriologischer Befunde	
	negativ	positiv
bis 300	668	11 = 1,6%
301 - 500	334	6 = 1,8%
501 - 800	268	8 = 3,0%
801 - 1000	114	5 = 4,4%
1001 - 2000	276	13 = 4,7%
2001 - 3000	104	3 = 2,9%
3001 - 4000	57	2 = 3,5%
4001 - 5000	31	4 = 12,9%
5001-10000	70	11 = 15,7%
über 10000	46	8 = 17,4%
Total	1968	71 = 3,6%

3.3.1.4. Der Pegel des Pyruvat-Pools in Beziehung zu postsekretorischen Faktoren im Rohmilchbereich

3.3.1.4.1. Turbulente Luftdurchströmung in Rohranlagen

Vorversuch:

In einer Zeitreihe über 5 Tage wurden 5 Milchproben bei 9°C aufbewahrt und täglich in parallelen Ansätzen auf ihren Pyruvat-Gehalt hin analysiert. Hierzu wurden die verschlossenen Standproben dreimal umgeschwenkt und daraufhin je 50 ml Milch in zwei Erlenmeyer-Kolben abgefüllt. Während aus einem Erlenmeyer-Kolben eine Probe für die Pyruvat-Bestimmung sofort entnommen wurde, wurde die Milch des zweiten Kolbens unverschlossen 3 Minuten lang auf einem Mixomatenturbulent mit Luft durchmischt. Erst hiernach wurde die Milch zur Pyruvat-Untersuchung angesetzt.

Während des gesamten Versuchsablaufs konnte keine Abweichung der Pyruvat-Werte aus den Parallelansätzen festgestellt werden.

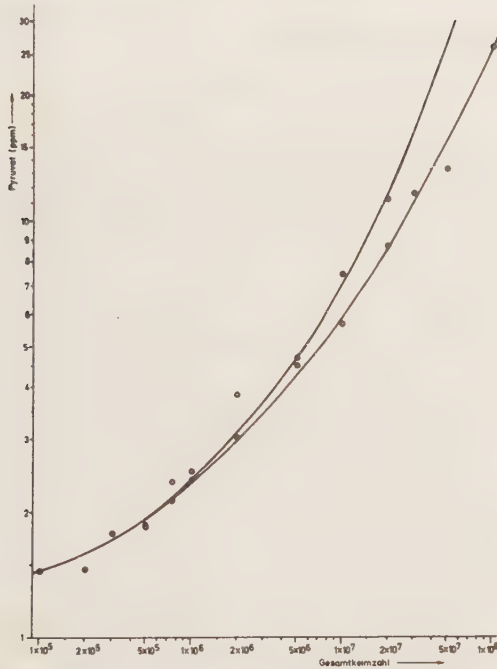
Hauptversuch:

Ein Acrylglasrohr von 750 mm Länge und 60 mm Innendurchmesser - entsprechend einem Füllungsgrad von 2,1 l - wurde mit roher Milch gefüllt und diese 30 Minuten lang über eine Öffnung am unteren Ende des Rohres mit 30 Liter Preßluft/min durchsetzt. Im Abstand von einer Minute wurde über eine zweite Öffnung eine Milchprobe von 10 ml entnommen und unmittelbar anschließend auf den Pyruvat-Gehalt hin untersucht. Hierzu wurde Milch mit hohem (18,5 ppm) und niedrigem (0,5 ppm) Pyruvat-Leerwert-Gehalt herangezogen. Während beider Meßreihen kam es zu keinen Veränderungen des Pyruvat-Gehaltes.

Der Versuch macht deutlich, daß selbst bei Vorliegen extremer Bedingungen ein Einwirken von Luft keinen oxydativen Abbau des Pyruvates zur Folge hat.

3.3.1.4.2. Keimzahl in Sammelmilch

Einmalige Stichproben:



Beziehungen zwischen Pyruvatgehalt und Gesamtkeimzahl
in Sammelmilch
(Untersuchung der Proben $\circ$ am gleichen Tag / $n=1709$;
 $\circ$ nach 24-stündiger Aufbewahrung bei 4°C / $n=210$)

Abbildung 29

Aus einer Molkerei mit täglicher Anlieferung der Sammelmilch in Kan-
nen und unzureichender Kühlung (ca. ein Drittel positiver Reduktions-
proben - siehe Kapitel 3.3.1.4.6.) wurden 1 709 Proben am gleichen Tag
der Probenahme und 210 nach 24-stündiger Aufbewahrung bei 4°C auf
den Pyruvat- und Keimgehalt untersucht. Hierbei zeigt sich, daß mit
einer Zunahme der Gesamtkeimzahl auch ein Anstieg der Pyruvat-Werte
einhergeht, der sich ab ca. 1 Million/ml mit mehr als 3 ppm deutlich ab-
zeichnet (s. Abb. 29).

Die relativ niedrigen Korrelationen von $r = + 0,57$ (1 709 Proben) und $r = + 0,56$ (210 Proben) lassen auf eine mesotrophe, vorwiegend glykolytisch ausgerichtete Keimflora schließen.

Im Verlauf einer Zeitreihe:

Tabelle 4

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN KEIM- UND PYRUVATGEHALT (Standversuch 9 ⁰ C - Inkubationszeit 4 Tage) SAMMELMILCH					
Inkubations- dauer in Tagen	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)			Keimzahl- bereich $\bar{X}_G$
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s	
0	320	2,25	2,60	1,516	$2,95 \times 10^5$
1	320	4,34	5,34	3,687	$9,04 \times 10^5$
2	295	9,13	12,04	9,467	$4,64 \times 10^6$
3	250	11,68	12,88	6,240	$2,82 \times 10^7$
4	111	11,02	11,45	3,105	$3,82 \times 10^7$

Während eines Standversuchs bei 9⁰ C über einen Zeitraum von 4 Tagen ist mit steigender Gesamtkeimzahl eine Zunahme des Pyruvat-Gehaltes zu verzeichnen, der innerhalb der einzelnen Tage allerdings eine relativ große Streuung aufweist (s. Tab. 4). Die Unterschiede zwischen den geometrischen und arithmetischen Pyruvat-Mittelwerten, von denen der erstere durchweg niedriger liegt, geben einen Hinweis auf die im linearen Bereich nicht normale Verteilung der Substanz.

Da Pyruvat ein Zwischenprodukt des Stoffwechsels der sich exponentiell vermehrenden Mikroorganismen ist, wird die Annäherung an eine Normalverteilung der Werte erst nach deren logarithmischer Transformation erreicht.

Der Korrelationskoeffizient der 1 296 Proben dieser Zeitreihe beträgt $r = 0,59$.

3.4.1.4.3. Zellgehalt in Sammelmilch

Tabelle 5

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRUVAT-UND ZELLGEHALT IN SAMMELMILCH				
Zellzahl in 1000	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)		
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s
bis 100	175	1,943	2,565	2,384
101 - 200	396	2,367	2,946	2,688
201 - 500	847	2,540	3,107	2,637
501 - 750	111	3,165	4,302	4,279
751 - 1000	35	2,545	3,543	4,047
1001 - 1500	39	3,415	4,213	3,086
1501 - 2000	10	3,754	4,060	1,467
2001 - 2500	3	5,599	8,667	7,728
2501 - 3000	6	2,593	2,750	0,946
über 3000	8	2,919	3,187	1,321
Total	1709	2,487	3,131	2,846

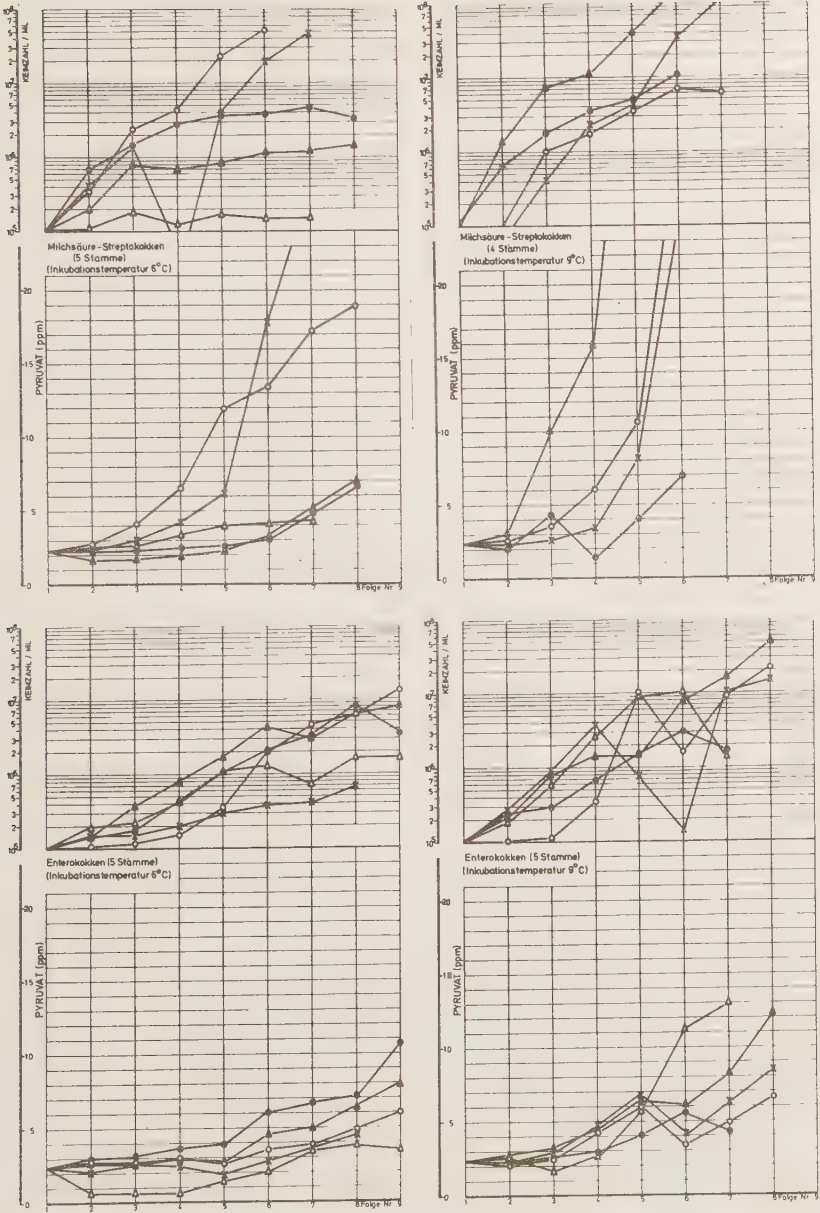
Die Tabelle 5 zeigt, daß aufgrund der z. T. sehr großen Streuung innerhalb der Pyruvat-Mittelwerte eine Beziehung zwischen Pyruvat und somatischen Zellen in Sammelmilch nicht gesichert werden kann. Es ist von Interesse, daß unter den 1 709 Proben nur 66 - entsprechend 3,8 % - einen Zellgehalt von mehr als 1 Million/ml Milch aufweisen. Unter diesen gibt es 8 Proben, die in ihrer Zellzahl über 3 Millionen/ml liegen. Das

bedeutet, daß nur etwa 0,5 % aller Sammelgemelksproben die Pyruvat-Ergebnisse durch ihren Zellgehalt bzw. die Aktivität euterpathogener Mikroorganismen beeinflussen können.

3.3.1.4.4. Keimzahl nach experimenteller Kontamination steriler Rohmilch mit Reinkulturen im Verlauf einer Zeitreihe

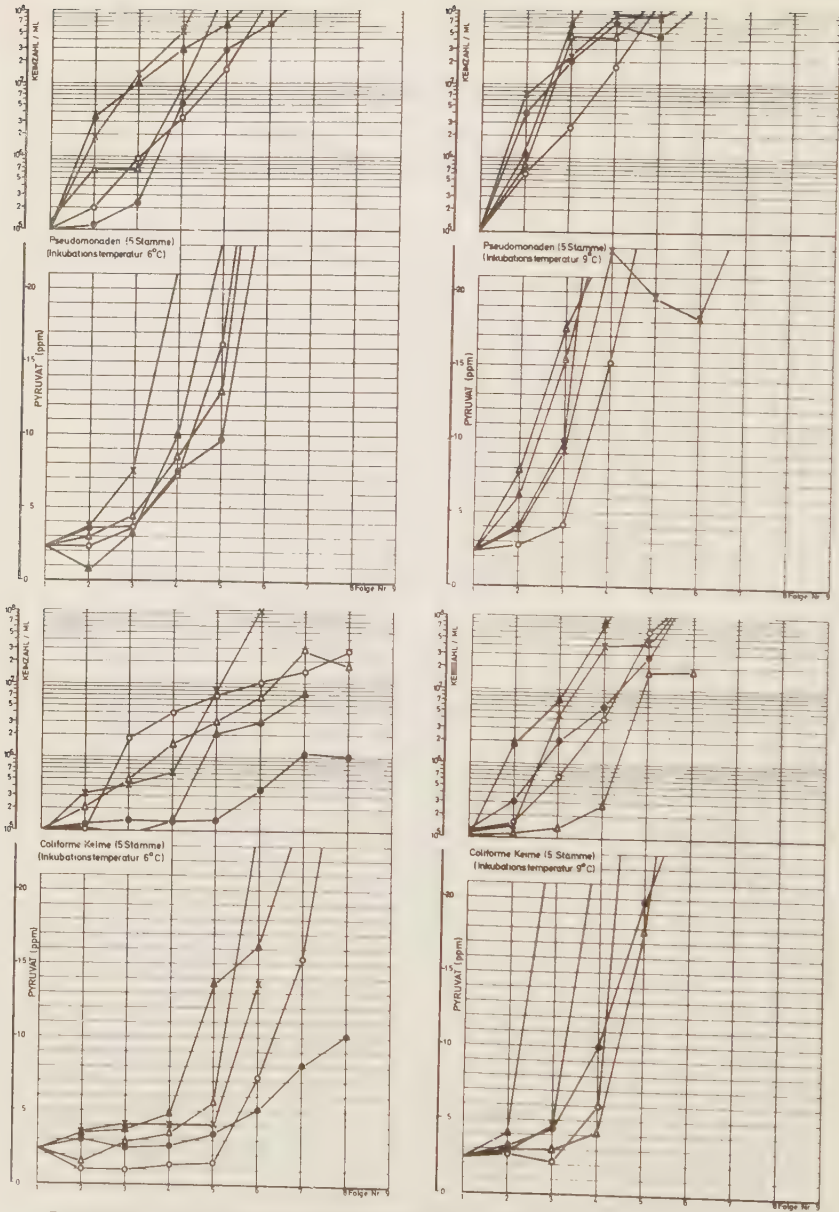
Aus der Untersuchung von Proben roher und pasteurisierter Milch in Zeitreihen können wegen der darin enthaltenen Mischflora keine Rückschlüsse auf die Bedeutung einzelner Mikroorganismengruppen für den Umfang der katabolen Prozesse gezogen werden. Daher wurde versucht, in steril gewonnener, inaktivierter Milch durch experimentelle Kontamination mit definierten Bakterienstämmen deren biochemische Aktivität am Pyruvat-Pool zu messen.

Die Darstellung des am Pyruvat bestimmten Stoffumsatzes erfolgt durch Auswahl typischer Vertreter der Pseudomonaden, der coliformen Keime, der Milchsäurestreptokokken und der Enterokokken unter besonderer Berücksichtigung psychrotropher Wachstumsbedingungen. Diese Keimarten gewinnen unter den Verhältnissen der milchwirtschaftlichen Praxis zunehmend an Bedeutung. Die acht Darstellungen (s. Abb. 30 und 31) veranschaulichen die biochemische Aktivität von je 4 bzw. 5 Arten der einzelnen Keimgruppen bei einer Inkubationstemperatur von 6° und 9°C:



DARSTELLUNG DER BIOCHEMISCHEN AKTIVITÄT VON MILCHSÄURE-STREPTOKOKKEN UND ENTEROKOKKEN
(Inkubationstemperatur 6°C und 9°C)

Abbildung 30



DARSTELLUNG DER BIOCHEMISCHEN AKTIVITÄT VON
PSEUDOMADEN UND COLIFORMEN KEIMEN
(Inkubationstemperatur 6°C und 9°C)

Abbildung 31

Milchsäurestreptokokken:

Bei einer Inkubation von 6°C zeigen die Milchsäurestreptokokken nur eine mäßige Wachstumsrate, während ihre biochemische Aktivität schon in Keimzahlbereichen von etwa 300 000 beginnt und nach 8 Tagen stark zunimmt. Diese Tendenz wird bei der 9°C -Aufbewahrungstemperatur bestätigt, wobei Pyruvat schon vom 5. Tage an deutlich ansteigt (s. Abb. 30).

Enterokokken:

Die unter Inkubationsbedingungen von 6° und 9°C geprüften Enterokokkenstämme zeichnen sich durch einen vergleichsweise langsamen Anstieg der Keimzahlen aus. Sie benötigen unter diesen Wachstumsbedingungen lange Generationszeiten. Analog dazu verhält sich der Anstieg von Pyruvat, der unter psychrotrophen Bedingungen erst am 5. Tag bei einer Keimzahl von 1 Million/ml beginnt und während einer Aufbewahrungstemperatur von 9°C bei einem Keimgehalt von 200 000/ml erst sehr leicht, ab 1 Million/ml rapide zunimmt (s. Abb. 30).

Insgesamt gesehen dürften Enterokokken demnach bei psychrotrophen Wachstumsbedingungen eine relativ geringe Bedeutung haben.

Pseudomonaden:

Diese Keimgruppe hebt sich sowohl bei 6°C als auch bei 9°C durch einen sehr starken Anstieg des Keimgehaltes von Ausgangswerten um 100 000 bis zu Endwerten von $10^6 - 10^7/\text{ml}$ innerhalb von 24 bis 48 Stunden hervor.

Diese für psychrotrophe Wachstumsbedingungen sehr hohe Vermehrungsrate bedingt entsprechende Stoffumsetzungen, die durch den früh einsetzen- den, starken Pyruvatanstieg gekennzeichnet sind. Pyruvat erscheint als empfindlicher Indikator der biochemischen Aktivität von Pseudomonaden (s. Abb. 31).

Coliforme Keime:

Diese Keimgruppe steht hinsichtlich ihrer Vermehrungsrate bei 6°C und 9°C zwischen Pseudomonaden und Milchsäurestreptokokken. Entsprechend ist ihre Stoffumsatzrate einzuordnen. Ein deutlicher Pyruvatanstieg beginnt

unter psychrotrophen Wachstumsbedingungen bei Keimzahlen von wenigen 100 000 bis 1 Million/ml. Bei Inkubationstemperaturen von 9°C läßt Pyruvat schon in Keimzahlbereichen von 300 000 bis 500 000 charakteristische Veränderungen erkennen (s. Abb. 31).

3.3.1.4.5, Metaboliten der Glyko-, Proteo- und Lipolyse

Im Verlauf einer Zeitreihe:

An 1 296 Sammelmilchproben wurden die Beziehungen zwischen dem Pyruvat-Gehalt und Parametern der Glyko-, Proteo- und Lipolyse während eines Standversuchs bei 9°C über einen Zeitraum von 4 Tagen ermittelt. Die Korrelationskoeffizienten zwischen Pyruvat und Milchsäure, Ammoniak und freien Fettsäuren betragen $r = 0,50$, $r = 0,44$ und $r = 0,53$ und zeigen, daß über den zentralen Stoffwechselparameter Pyruvat die laufend durch eine Mischflora in unterschiedlicher Art und Intensität entstehenden Zwischen-substanzen der drei Stoffwechselwege - der Glyko-, Proteo- und Lipolyse - im einzelnen nur partiell erfaßt werden.

3.3.1.4.6, Reduktionsvermögen, Eiweißstabilität und Sensorik

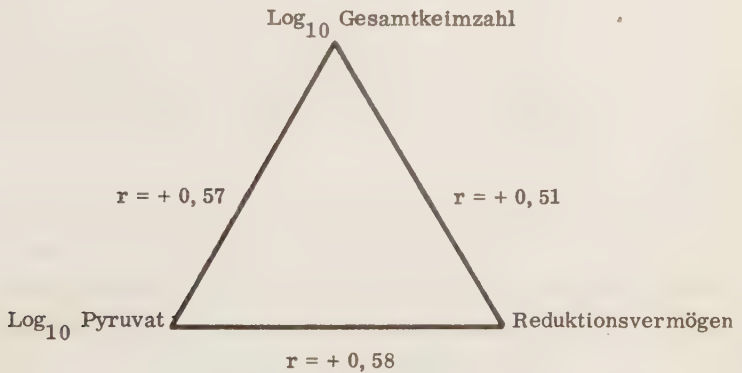
Reduktionsvermögen (einmalige Stichproben):

Tabelle 6

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRUVATGEHALT UND REDUKTIONSVERMÖGEN (einmalige Stichproben) SAMMELMILCH				
Resazurin- reduktions- stufe	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)		
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s
I	1 155	1,991	2,229	1,148
II	410	3,242	3,826	2,491
III	144	6,947	8,398	5,678
Total	1 709	2,487	3,131	2,846

Aus der Tabelle 6 wird ersichtlich, daß sich unter den 1 709 untersuchten Sammelmilchproben 554 - entsprechend 32,4 % - in den Reduktionsstufen II und III befinden. Dieser hohe Anteil von ca. einem Drittel Proben verstärkten Reduktionsvermögens läßt auf eine Keimflora schließen, die im wesentlichen glykolytischer Natur ist. Die Ursachen dafür liegen zum einen in dem eng begrenzten Einzugsgebiet dieser Molkerei, demzufolge in einer ständigen Wiederholung des gleichen Materials, zum anderen in der unzureichenden Kühlung der Milch bei täglicher Anlieferung.

Unter diesen Bedingungen haben die Bestimmungen des Redoxpotentials und des Pyruvat-Gehaltes in Bezug auf den Keimgehalt etwa die gleiche Aussagekraft, wie aus der Abbildung 32 hervorgeht.



KORRELATIONEN ZWISCHEN REDUKTIONSVERMÖGEN
(RESAZURINPROBE) UND LOGARITHMUS VON PYRUVAT-
UND GESAMTKEIMGEHALT IN SAMMELMILCH ($n = 1709$)

Abbildung 32

Eiweißstabilität (einmalige Stichproben):

Tabelle 7

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRUVATGEHALT UND EIWEISS- STABILITÄT IN SAMMELMILCH (Test mit doppelter Alkoholkonzentration, einmalige Stichproben)				
Denaturierungs- grad	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)		
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s
-	795	2,309	2,763	2,195
+	686	2,472	3,080	2,597
++	153	3,182	4,089	3,267
+++	75	3,487	5,559	6,388
Total	1709	2,487	3,131	2,846

Innerhalb dieser 1 709 untersuchten Sammelmilchproben, für die die im Kapitel "Reduktionsvermögen" angegebenen Eigenschaften gelten, ergibt sich mit Erhöhung des Denaturierungsgrades zwar eine leichte Zunahme des Pyruvatgehaltes, die jedoch statistisch nicht gesichert werden kann (s. Tab. 7).

Sensorik (einmalige Stichproben):

Tabelle 8

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRUVATGEHALT UND GERUCHSEIGENSCHAFTEN IN SAMMELMILCH (einmalige Stichproben)				
Geruch- Wertmale	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)		
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s
3	260	2,552	2,969	2,097
2	145	3,086	3,774	2,555
1	113	4,095	5,874	5,484
0	20	11,502	13,901	6,180
Total	538	2,970	3,685	2,876

Tabelle 9

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRUVATGEHALT UND GESCHMACKSEIGENSCHAFTEN IN SAMMELMILCH (einmalige Stichproben)				
Geschmack- Wertmale	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)		
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s
10	191	2,592	3,018	2,241
9	100	3,438	4,028	2,358
8	32	5,082	6,703	5,621
7 - 6	28	7,256	9,186	6,688
6	15	14,505	15,740	5,577
Total	366	3,885	4,609	3,045

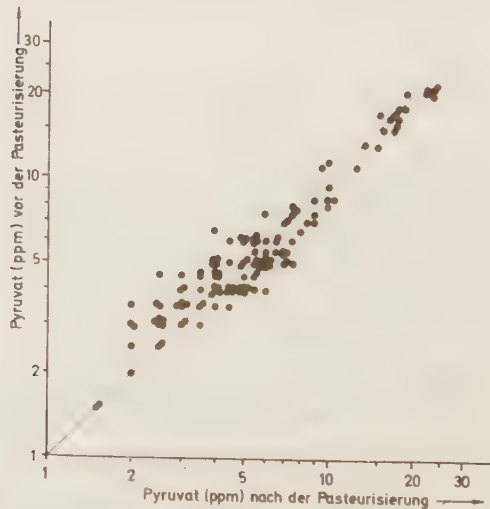
Die Tabellen 8 und 9 machen deutlich, daß mit Zunahme von Geruchs- und Geschmacksabweichungen im Mittelwert ein Anstieg des Pyruvat-Pegeis zu verzeichnen ist. Allerdings streuen die Pyruvat-Werte auch hier im einzelnen erheblich. Hinsichtlich des Materials gelten die gleichen Charakteristika wie im Kapitel "Reduktionsvermögen" beschrieben.

Der Korrelationskoeffizient der Untersuchungsergebnisse dieser Sammelmilchproben zwischen zwei Personen beträgt $r = + 0,79$.

3.3.1.5. Der Pegel des Pyruvat-Pools in Beziehung zu postsekretorischen Faktoren im Trinkmilchbereich

3.3.1.5.1. Pasteurisierung

Vorversuch (Hoherhitzung):

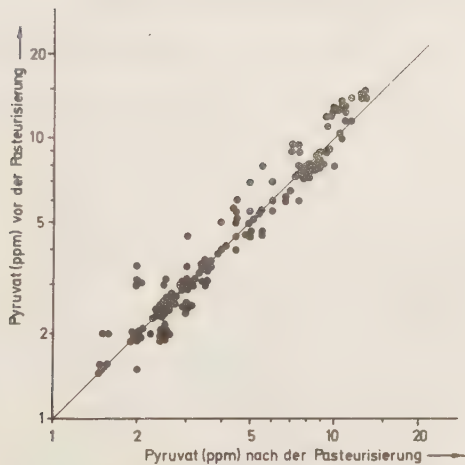


Pyruvatgehalt in Milch vor und nach der
Pasteurisierung (85°C/10sec) n = 136

Abbildung 33

165 mit ca. 5 ml roher Sammelmilch gefüllte Reagenzglasröhrchen wurden in ein Labor-Wasserbad verbracht, auf 85°C erwärmt und 10 Sekunden bei dieser Temperatur inkubiert. Nach der Pasteurisierung wurden die Milchproben für die Bestimmung des Pyruvat-Gehaltes gekühlt. Die Abbildung 33 verdeutlicht den Pyruvat-Gehalt vor und nach der Hoherhitzung in vitro.

Hauptversuch (Kurzzeiterhitzung):



Pyruvatgehalt in Milch vor und nach der
Pasteurisierung ($71^{\circ}\text{C}/40\text{sec}$) $n = 151$

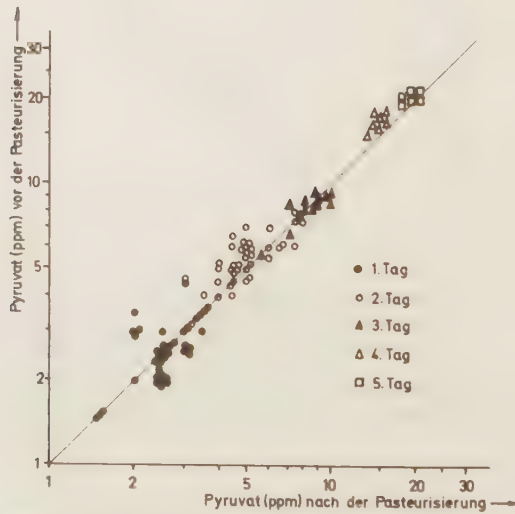
Abbildung 34

160 Proben roher Sammelmilch durchliefen in einer Menge von jeweils 1 - 2 Litern einen Labor-Pasteurisierungsapparat und wurden dabei für 40 Sekunden auf 71°C erhitzt, wobei Temperatur- und Zeitschwankungen

von $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ und 2 Sekunden toleriert wurden. Für die Pyruvat-Analyse wurde direkt im Anschluß an den Durchlauf jeweils eine Milchprobe von 10 ml entnommen. Die Abbildung 34 veranschaulicht den Pyruvat-Gehalt der Milch vor und nach der Kurzzeiterhitzung.

Beide Abbildungen zeigen, daß die gegeneinander aufgetragenen Pyruvat-Werte in einer relativ geringen Streuung längs der 90° -Winkelhalbierenden verlaufen. Dieses Ergebnis wird durch den nach logarithmischer Transformation ermittelten Korrelationskoeffizienten bestätigt, der für die Hocherhitzung $r = 0,97$ und für die Kurzzeiterhitzung $r = 0,96$ beträgt.

Im Verlauf einer Zeitreihe (Kurzzeiterhitzung):



Pyruvatgehalt in Milch vor und nach der Pasteurisierung ($71^{\circ}\text{C}/40\text{sec}$) über einen Zeitraum von 5 Tagen bei 6°C

Abbildung 35

Es wurde ferner der Pasteurisierungseffekt innerhalb einer Zeitreihe von 5 Tagen bei einer Aufbewahrungstemperatur der rohen Sammelmilch von 6°C geprüft. Die aus ca. 2 Litern bestehenden Proben wurden täglich der Kurzzeiterhitzung im Labor-Pasteur unterzogen und vor- bzw. nachher auf ihren Pyruvat-Gehalt untersucht. Nach Abbildung 35 kommt zwischen den täglich vollzogenen Pasteurisierungsdurchgängen eine merkliche Keimvermehrung zustande, die sich in sprunghaft erhöhten Pyruvat-Gehalten ausdrückt, die durch eine Pasteurisierung kaum verändert werden.

Die drei Untersuchungsgänge besagen, daß Pyruvat durch eine Pasteurisierung in der quantitativen Nachweisbarkeit unverändert bleibt.

3.3.1.5.2. Keimzahl in pasteurisierter Trinkmilch

Im Verlauf einer Zeitreihe:

Tabelle 10

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN KEIM- UND PYRUVATGEHALT (Standversuch 6°C - Inkubationszeit 4 Tage) PASTEURISIERTE MILCH					
Inkubations- dauer in Tagen	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)			Keimzahl- bereich $\bar{X}_G$
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s	
0	14	1,69	1,71	0,256	$1,58 \times 10^4$
1	14	2,06	2,07	0,181	$1,60 \times 10^5$
2	14	2,93	2,96	0,458	$2,70 \times 10^5$
3	14	7,83	7,93	1,298	$1,59 \times 10^6$
4	14	11,59	11,79	2,118	$3,52 \times 10^6$

Tabelle 11

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN KEIM- UND PYRUVATGEHALT (Standversuch 9 ^o C - Inkubationszeit 4 Tage) PASTEURISIERTE MILCH					
Inkubations- dauer in Tagen	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)			Keimzahl- bereich $\bar{X}_G$
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s	
0	239	1,19	1,29	0,583	$4,32 \times 10^4$
1	239	2,00	2,33	1,597	$1,65 \times 10^5$
2	236	4,46	5,74	4,605	$3,18 \times 10^6$
3	204	7,53	9,08	6,014	$3,04 \times 10^7$
4	137	11,36	13,01	6,700	$1,06 \times 10^8$

Tabelle 12

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN KEIM- UND PYRUVATGEHALT (Standversuch 12 ^o C - Inkubationszeit 2 Tage) PASTEURISIERTE MILCH					
Inkubations- dauer in Tagen	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)			Keimzahl- bereich $\bar{X}_G$
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s	
0	25	1,00	1,06	0,300	$7,54 \times 10^4$
1	25	3,81	3,76	1,162	$2,06 \times 10^6$
2	25	14,18	15,42	5,958	$4,15 \times 10^7$

Im Verlaufe der Zeitreihen bei 6^o, 9^o und 12^oC kommt es neben der Zunahme der Gesamtkeimzahl zu einem deutlichen Anstieg des Pyruvat-Pools. Dabei bleibt die Streuung im 6^oC-Standversuch gering, so daß die Beziehung zum Keimgehalt mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = + 0,89$ ($n = 70$) gekennzeichnet ist. Die Korrelationskoeffizienten der 9^oC- und 12^oC-Standversuche lauten $r = + 0,68$ ($n = 1055$) und $r = + 0,82$ ($n = 75$).

Damit sind die Korrelationen deutlich höher als bei Reduktionsproben unter gleichen Bedingungen (siehe Kapitel 2.1.2.3.1.). Allerdings ist aufgrund des geringen Probenmaterials in den 6^oC- und 12^oC-Standversuchen die Repräsentativität der zugehörigen Korrelationskoeffizienten eingeschränkt.

3.3.1.5.3. Metaboliten der Glyko-, Proteo- und Lipolyse

Im Verlaufe einer Zeitreihe:

Tabelle 13

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRUVATGEHALT UND PARAMETERN DER GLYKO-, PROTEO- UND LIPOLYSE (Standversuche) PASTEURISIERTE MILCH				
Anzahl Proben	Inkubation	Korrelation zwischen Pyruvat und		
		Milchsäure (r)	Ammoniak (r)	Freien Fettsäuren (r)
70	6 ^o C	- 0,40	+ 0,69	+ 0,97
1 055	9 ^o C	+ 0,44	+ 0,56	+ 0,68
75	12 ^o C	+ 0,56	+ 0,59	+ 0,92

Die in Tabelle 13 bei 6°C deutlichere Beziehung zur Proteo- bzw. Lipolyse fand ihre Bestätigung schon im Kapitel 3.3.1.4.4. (vorherrschende Aktivität von Pseudomonaden und coliformen Keimen unter psychrotrophen Inkubationsbedingungen). Bemerkenswert ist die negative Korrelation bei den 6°C-Proben zur Milchsäure. Unter psychrotrophen Bedingungen sind offenbar glykolytische Prozesse kaum vorhanden. Bei einem Teil der Proben ist ein weiterer Abbau der Milchsäure feststellbar.

Auch hier geben die Korrelationskoeffizienten der 6°C- und 12°C-Standversuche aufgrund der niedrigen Probenzahl nur Hinweise.

3.3.1.5.4. Reduktionsvermögen, Eiweißstabilität und Sensorik

Im Verlaufe einer Zeitreihe:

Tabelle 14

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRUVATGEHALT UND RESAZURIN-REDUKTION, SENSORIK UND EIWEISS-STABILITÄT UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER KEIMZAHL (Standproben 6° C - Inkubationszeit 4 Tage) PASTEURISIERTE MILCH														
Inkubations- dauer in Tagen	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)			Gesamt- keimzahl $\bar{X}_G$	Resazurin- Reduktions- stufen			Sensorik ^{*)}		Eiweiß- stabilität ^{**)}			
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s		I	II	III	-	+	-	+	++	+++
0	50	2,923	2,941	0,323	$1,2 \times 10^5$	50	0	0	50	0	50	0	0	0
1	50	3,434	3,451	0,347	$1,1 \times 10^5$	50	0	0	50	0	50	0	0	0
2	50	3,295	3,255	0,605	$1,1 \times 10^5$	50	0	0	50	0	50	0	0	0
3	50	4,532	4,931	2,341	$2,8 \times 10^5$	46	4	0	29	21	50	0	0	0
4	50	4,780	5,580	3,414	$1,0 \times 10^6$	38	0	12	14	36	46	4	0	0
Total	250	3,700	4,026	2,139	$3,2 \times 10^5$	234	4	12	193	57	246	4	0	0

*) Sensorik:

- sehr gut/gut; + leicht/stark fehlerhaft

**) Eiweiß-Stabilität:

doppelte Alkoholprobe

Tabelle 15

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PYRUVATGehALT UND RESAZURIN-REDUKTION, SENSORIK UND EIWEISS-STABILITÄT UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER KEIMZAHl (Standproben 9° C - Inkubationszeit 4 Tage) PASTEURISIERTE MILCH														
Inkubations- dauer in Tagen	Anzahl Proben	Pyruvat (ppm)			Gesamt- keimzahl $\bar{X}_G$	Resazurin- Reduktions- stufen			Sensorik ^{*)}		Eiweiß- stabilität ⁺⁺⁾			
		$\bar{X}_G$	$\bar{X}_A$	s		I	II	III	-	+	-	+	++	+++
0	50	2,171	2,210	0,437	$1,6 \times 10^5$	50	0	0	50	0	50	0	0	0
1	50	4,444	4,520	0,768	$1,8 \times 10^5$	50	0	0	50	0	50	0	0	0
2	50	3,113	3,140	0,436	$2,0 \times 10^5$	50	0	0	47	3	50	0	0	0
3	50	6,596	7,550	3,934	$1,3 \times 10^6$	50	0	0	9	41	50	0	0	0
4	50	9,017	11,300	5,874	$6,6 \times 10^6$	17	17	16	0	50	46	4	0	0
Total	250	4,471	5,744	4,601	$1,3 \times 10^6$	217	17	16	156	94	246	4	0	0

+) Sensorik:

- sehr gut/gut; + leicht/stark fehlerhaft

++) Eiweiß-Stabilität:

doppelte Alkoholprobe

Im Verlaufe der 6°C-Zeitreihe (s. Tab. 14) bleibt die Keimzahl bis zum 2. Tag auf gleicher Höhe, während der Pyruvat-Pool schon von Beginn an zunimmt. Erst relativ spät zeigen Reduktionsvermögen, sensorische Eigenschaften und Eiweißstabilität dieser Milch Veränderungen. Insbesondere letztere erweist sich als eine träge Meßgröße.

In der 9°C-Standprobe (s. Tab. 15) wird die hohe Empfindlichkeit von Pyruvat bestätigt. Auch am 4. Tag bei einem Keimgehalt von 6,6 Millionen/ml Milch wird die Eiweißstabilität nur in 4 der insgesamt 50 Proben geringgradig beeinflusst.

Es wurde ferner festgestellt, daß bei Zeitreihen unterschiedlicher Inkubationstemperaturen (6°C und 9°C) nach Ablauf von mindestens 3 Tagen einige Trinkmilchproben einen spontanen, rapiden Pyruvatabfall auf Größenordnungen unterhalb der Ausgangswerte aufweisen. Dieser Pyruvat-Abfall wird nur bei Proben beobachtet, deren Pyruvatwert - gemessen an den Inkubationsbedingungen - relativ niedrig und deren Eiweißstabilität mit

schon starken Einbußen verbunden ist. Zudem wird gleichzeitig mit dieser inversen Reaktion ein Anstieg der Milchsäurewerte bis zu 3 000 ppm angezeigt, während alle anderen in ihren Pyruvatwerten weiter angestiegenen Proben einen Milchsäure-Anteil von 200 ppm bis 400 ppm aufweisen. Der Mechanismus dieser bisher nur an wenigen Trinkmilchproben beobachteten Pyruvat-Reduktion bedarf weiterer Aufklärung.

3.3.2. Teilautomatisierung der Plattenzählung mit Hilfe der Computer-Bild-Analyse

3.3.2.1. Beziehungen zur visuellen Zählung

3.3.2.1.1. Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Die Übereinstimmung zwischen Zählergebnissen der Gesamtkeimzahlbestimmung in der Computer-Bild-Analyse und visuellen Zählbefunden ist - wie die Tabelle 16 deutlich macht - sehr gut. Die Korrelationskoeffizienten der für das KOCH'sche Plattenverfahren geltenden Koloniezahl sind durch eine Umrandung gekennzeichnet.

Tabelle 16

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN VISUELLER ZÄHLUNG UND DER IM COMPUTER-BILD-ANALYSATOR (Gesamtkeimzahl)				
	Trinkmilch		Rohmilch	
Verdünnungsstufe	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-4}
Korrelationskoeffizient	r	r	r	r
Gesamtkeimzahl	0,971	0,899	0,985	0,986

Anmerkung: Die Korrelationskoeffizienten der für das KOCH'sche Plattenverfahren geltenden Koloniezahl (30-300 Kolonien pro Kulturplatte) sind durch eine Umrandung gekennzeichnet

3.3.2.1.2. Selektive Zählung bestimmter Keimgruppen

Unter den einzelnen Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-4} befindet sich die für das KOCH'sche Plattenverfahren geltende Koloniezahl der einzelnen Keimgruppen durchweg innerhalb derjenigen Verdünnungsstufe, die den optimalen Korrelationskoeffizienten zwischen beiden Zählmethoden aufweist. In Tabelle 17 ist dieser Korrelationskoeffizient ebenfalls durch eine Umrandung dargestellt.

Tabelle 17

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN VISUELLER ZÄHLUNG UND DER IM COMPUTER-BILD-ANALYSATOR (Keimgruppen)							
	Trinkmilch			Rehmilch			
Verdünnungsstufe	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Korrelationskoeffizient	r	r	r	r	r	r	r
Coliforme Keime	--	--	--	0,984	0,981	--	--
Gesamt-Streptokokken	0,944	0,996	--	--	--	0,982	0,985
Enterokokken	--	0,990	0,905	--	--	--	--
Pseudomonaden und Aeromonaden	0,976	0,976	--	--	0,993	0,969	0,889
Thermophile Keime	--	--	--	--	--	0,993	--
Psychrotrophe Keime	--	0,951	0,474	--	--	0,978	0,905

Anmerkung: Die Korrelationskoeffizienten der für das
KOCH'sche Plattenverfahren geltenden
Koloniezahl (30 - 300 Kolonien pro Kultur-
platte) sind durch eine Umrandung gekennzeichnet

Die Übereinstimmung zwischen beiden Zählverfahren für die selektive
Bestimmung einzelner Keimgruppen ist nahezu absolut.

3.3.2.2. Wiederholbarkeit

Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit der Zählungen im Computer-Bild-Analysator wurde die Koloniezahl aller 2 200 Kulturplatten durch zweimalige Veränderung der Position auf dem Epidiaskop bestimmt. Für die drei Zählungen stellt die Tabelle 18 die Korrelationskoeffizienten aller für Gesamtkeimzahl und Keimgruppen angesetzten Verdünnungsstufen dar. An ihnen wird die fast absolute Reproduzierbarkeit der Zählergebnisse deutlich.

Tabelle 18

WIEDERHOLBARKEIT DER ZÄHLUNG IM COMPUTER-BILD-ANALYSATOR (3 Zählungen je Kulturplatte)		
Korrelationskoeffizient	Trinkmilch	Rohmilch
	r	r
Gesamtkeimzahl	0,987	0,995
Coliforme Keime	--	0,993
Gesamt-Streptokokken	0,989	0,995
Enterokokken	0,988	--
Pseudomonaden und Aeromonaden	0,980	0,960
Thermophile Keime	--	0,998
Psychrotrophe Keime	0,926	0,974

3.3.2.3. Leistungsfähigkeit

Die Leistungsfähigkeit des Computer-Bild-Analysators ist dadurch gekennzeichnet, daß dieses Gerät bis zu 21 Zählungen eines Objekts innerhalb 1 Sekunde durchführt, ständig in Betrieb gehalten werden kann und über eine Datenverarbeitungsanlage voll automatisierbar ist.

Für die Staubpartikelentfernung, Objektzuführung und Prozeßkontrolle ist jedoch die ständige Anwesenheit einer Person erforderlich. Werden die Zählergebnisse nicht in ein Datenverarbeitungsgerät weitergeleitet, beläuft sich der Zeitaufwand für die Keimzahlbestimmung mit Protokollierung der Resultate auf ca. 20 Sekunden pro Kulturplatte. Von einer Person kann innerhalb einer Stunde die Keimzahl von mindestens 150 Kulturplatten bestimmt und registriert werden; das ergibt ohne große Mühen eine Plattenanzahl von über 1 000 pro Tag.

Abgesehen von den physischen Erleichterungen gegenüber der visuellen Zählung erzielt dieses Gerät während eines 8-Stunden-Tages bei voller Auslastung eine Leistung, die zehnfach höher liegt als die einer technischen Assistentin. Eine Wirtschaftlichkeit des Computer-Bild-Analysators ist mit einer Mindestanzahl von 100 täglich auszuzählenden Kulturplatten gewährleistet.

4.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die lebensmittelhygienische Bedeutung saprophytärer Mikroorganismen in roher und pasteurisierter Milch ist vorwiegend in Art und Ausmaß glyko-, proteo- und lipolytischer Veränderungen zu sehen. Der bakterielle Katabolismus hängt von der kontaminierenden Flora und ihren Wachstumsbedingungen in der Milch ab. In unzureichend gekühlter Milch dominieren solche Mikroorganismen, deren Stoffwechselbild vorwiegend durch glykolytische Prozesse geprägt ist, während in gekühlter Milch Proteo- und Lipolyse vorherrschen. Zur Messung dieser Veränderungen dienen der quantitativ-morphologische Nachweis von Keimen - meist in Form von Koloniezählverfahren - oder die Bestimmung analoger physikalischer bzw. chemischer Meßgrößen. Unter glykolytischen Bedingungen, wie sie in der Vergangenheit unter praktischen Verhältnissen der Milchwirtschaft dominierten, hat sich die leicht durchzuführende Messung des Redoxpotentials in Form von Reduktionsproben gut bewährt. Koloniezählverfahren haben sich hierfür wegen der erheblichen personellen und sachlichen Aufwendungen nicht durchgesetzt.

Die mit der Tiefkühlung verbundene Verschiebung der Keimflora und die Änderung der biochemischen Aktivität erfordern heute neue Methoden zum Nachweis der unter diesen Bedingungen vorwiegend auftretenden proteo- und lipolytischen Prozesse. Zweifellos wird die Praktikabilität von Koloniezählverfahren durch die elektronische Mikrokoloniezählung, deren Prinzip den psychrotrophen Wachstumsbedingungen entgegenkommt, wesentlich erhöht. Aber auch hier bleiben - wie für jedes Koloniezählverfahren - die Probleme einer repräsentativen Probenahme und einer relativ aufwendigen Konservierung bestehen. Auf der Suche nach einem geeigneten Stoffwechselparаметer zur Charakterisierung des biochemischen Status von Milchproben erwies sich Pyruvat aus folgenden Gründen als geeignet:

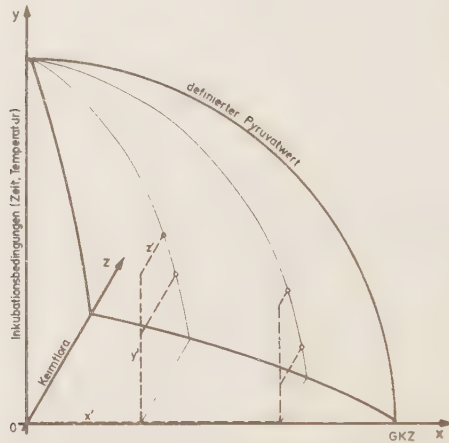
1. Pyruvat steht unmittelbar vor dem Zitronensäure-Zyklus, in den alle Stoffwechselwege einmünden.
2. Pyruvat ist in der kontinuierlichen Durchflußanalyse mit hoher Sicherheit und in einer Frequenz von 80 - 120 Proben pro Stunde weitgehend bedienungsneutral nachzuweisen.

3. Der enzymatische Nachweis von Pyruvat mit LDH ist so spezifisch, daß andere Einflußgrößen wie β -Hydroxy-Pyruvat, Glyoxalat, α -Keto-butyrat, α -Keto-n-valerat und Oxalacetat für den vorgesehenen Zweck vernachlässigt werden können.
4. Der normale "background" von Pyruvat in mikrobiologisch unbelasteter Milch liegt unterhalb 3 ppm. Durch bakteriell-katabole Reaktionen können Werte gemessen werden, die um mehrere Zehnerpotenzen über den Normalwerten liegen. Dieses breite Spektrum eröffnet eine weite Differenzierung von Einzelproben. Pyruvat sammelt sich also in Form eines Pools an, dessen Pegel zwischen Zu- und Abfluß eine erhebliche Variationsbreite aufweist.

Für eine sachgerechte Interpretation der Pyruvatwerte müssen die seiner Bildung zugrunde liegenden Faktoren berücksichtigt werden. Diese stellen nicht nur die Anzahl der Mikroorganismen, sondern auch die durch ihre Art und Wachstumsbedingungen gekennzeichnete biochemische Aktivität dar. Im Extrem würde eine hohe Primärkontamination ohne Vermehrung der Keime nicht als Anstieg des Pyruvat-Pools meßbar sein, während andererseits relativ wenige, über längere Zeit stoffwechselaktive Bakterien zu einem deutlichen Anstieg des Pools führen. Gemessen wird also in jedem Falle der aktuelle biochemische Status. Um die über eine quantitative oder qualitative Keimbestimmung hinausgehende bakteriell-katabole Gefährdung des Substrates, d. h. die Haltbarkeit, zu objektivieren, empfiehlt sich die wiederholte Messung nach einer Belastung durch eine Inkubation bei 10⁰ C bis 20⁰ C. Der sich daraus ergebende Pyruvat-Differenzwert (Δ = Delta-Wert) dürfte die umfassendste Information über die aktuelle und potentielle bakteriologisch-biochemische Beschaffenheit des Substrates liefern.

Geht man davon aus, daß der Pyruvat-Gehalt bestimmt wird durch die Gesamtkeimzahl, das Keimspektrum innerhalb dieser Gesamtkeimzahl (Keimflora) und die Inkubationsbedingungen (Zeit, Temperatur), bei denen sich diese Keimzahl entwickeln konnte, so bietet sich folgende Modellvor-

stellung an (s. Abb. 36):



Modellvorstellung über die den Pyruvatwert bestimmenden Einflußgrößen

Abbildung 36

Die genannten drei Einflußgrößen spannen als Koordinatenachsen einen drei-dimensionalen Raum auf. Die Verbindung eines beliebigen Punktes innerhalb dieses Raumes mit dem Nullpunkt des Achsensystems gibt durch ihre Größe den Pyruvatwert an, der aus der jeweiligen Kombination der drei Koordinaten resultiert. Jeder Punkt im Raum ist durch seine Koordinaten eindeutig festgelegt. Alle Punkte gleichen Abstandes vom Nullpunkt kennzeichnen einen gleichen Pyruvat-Wert und können auf dem Teil einer Kugelschale liegend gedacht werden. Das bedeutet für einen definierten Pyruvat-Gehalt, daß er durch unendlich viele Kombinationsmöglichkeiten der drei Koordinaten zustandekommen kann.

Diese Betrachtungsweise macht deutlich, daß der Pyruvat-Gehalt als Ausdruck aller bakteriell-wirksamen Einflußgrößen eine umfassende Aussage über die bakteriologisch-biochemische Wertigkeit der Milch ermöglicht.

Darüberhinaus zeigt sich, daß durch eine Beziehung zur Gesamtkeimzahl allein der Aussagewert des Parameters Pyruvat nicht hinreichend zu beschreiben ist. Dennoch ist in der Praxis ein relativ enger Zusammenhang zwischen Gesamtkeimzahl und Pyruvat-Gehalt zu erwarten, solange Keimflora und psychrotrophe Wachstumsbedingungen nur innerhalb enger Grenzen variieren.

Die Richtigkeit dieses Denkmodells wurde durch die Ergebnisse der experimentellen Kontamination steriler Rohmilch mit Reinkulturen definierter Keimgruppen und psychrotrophen Inkubationsbedingungen durch die sequentielle Pyruvatbestimmung untermauert. Unter diesen Bedingungen zeigt sich eine sehr enge Beziehung zwischen Keimzahl und Pyruvat-Gehalt. Unter Praxisverhältnissen dagegen wirken zahlreiche andere Faktoren ein, wie Synergismus und Antagonismus der Milchflora in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur. Diese Verhältnisse sind in Zeitreihen-Versuchen mit roher und pasteurisierter Milch wiedergegeben. Offensichtlich werden durch Pyruvat vorwiegend proteo- und lipolytische Prozesse deutlicher angezeigt als glykolytische Veränderungen. Das erklärt sich durch eine relativ rasche Umwandlung des Pyruvats in Milchsäure unter mesotrophen Bedingungen und bei längerer Aufbewahrungszeit und steht in Übereinstimmung mit dem relativ hohen Pyruvat-Bildungsvermögen von Proteo- und Lipolyten.

Diese Feststellung eröffnet für die Praxis der Milchhygiene interessante Aspekte: Pyruvat charakterisiert vorwiegend milchhygienisch unerwünschte proteo- und lipolytische Prozesse, wie sie unter psychrotrophen Bedingungen auftreten und verhält sich somit gegenläufig zur Aussage der Reduktionsproben.

Bevor jedoch der Einsatz einer Pyruvat-Bestimmung zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit der Milch für die Praxis diskutiert werden kann, müssen alle sekretorischen und postsekretorischen Einflußgrößen analysiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit angestellten Untersuchungen hierüber haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Laktationsphysiologische Faktoren wie Viertelposition, Laktationsnummer und -stadium zeigen keine Beziehung zum Pyruvat-Pool.
2. Die Anzahl somatischer Zellen beeinflusst im Bereich der biologischen Norm und darüber hinausgehend bis zu ca. 3 Millionen Zellen/ml Milch nicht den Pyruvat-Normalwert.
3. Eine Erhöhung des Pyruvat-Pools bei Mastitiden scheint weniger auf die Anzahl somatischer Zellen als vielmehr auf die biochemische Aktivität der Mastitiserreger zurückzuführen zu sein.
4. Turbulente Luftdurchströmungen, denen die Milch bei Gewinnung, Transport und Aufbewahrung ausgesetzt sein kann, haben keinen Einfluß auf die Pyruvat-Werte.
5. Die Feststellung, daß die mikrobiologische Belastung der Rohmilch - gemessen an Pyruvat - über die Thermoresistenz dieser Substanz, d. h. über die Pasteurisierung hinweg in den Trinkmilchbereich übernommen wird, eröffnet erstmals neue Beurteilungsmöglichkeiten: Pyruvat zeichnet ein sich insgesamt addierendes, lückenloses Bild der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit der Milch von der Gewinnung bis zum Konsum.

Insgesamt gesehen wird aus diesen Untersuchungen deutlich, daß Pyruvat unter den Bedingungen der Praxis ausschließlich von der Aktivität der Bakterien abhängig ist. Da die Substanz in gelöster Form vorliegt, sind die Anforderungen an eine repräsentative Probenahme gegenüber denen für eine Keimzahlbestimmung gering. Durch Zusatz von Formalin ist darüberhinaus eine einfache, billige und wirksame Konservierung über mindestens zwei Tage bei 20°C möglich. Diese formalinfixierten Milchproben können in gleicher Weise für die Bestimmung der Anzahl somatischer Zellen nach chemischer Vorbehandlung der Proben in elektronischen Partikelzählern oder der kontinuierlichen Durchflußanalyse herangezogen werden. Die Kosten der Pyruvatbestimmung liegen deutlich unter denen einer bakteriologischen Untersuchung mit Hilfe von Koloniezählverfahren:

Bei einem Analysensystem und dem Durchsatz von 150 000 Proben im Jahr betragen die Kosten für Personal, Chemikalien und Geräte, sowie deren Reparatur und Abnutzung DM 0,30, bei zwei Analysen-Systemen DM 0,22 je Milchprobe.

Unterhalb des bakteriologischen Grenzwertes, der durch einen kontinuierlichen Anstieg des Pyruvat-Pools gekennzeichnet ist und etwa in der Größenordnung von 1 Million Keimen/ml liegt, vermittelt jedoch die Bestimmung der Gesamtkeimzahl bzw. selektiv gezüchteter Keimgruppen im Plattenverfahren eine Information über den bakteriologisch-hygienischen Status der Milch. Werte dieser Größenordnung sind bei der Trinkmilch nach der Pasteurisierung regelmäßig zu erwarten. Hier und in solchen Rohmilchbereichen mit geringen Keimzahlwerten liegt ein geeignetes Anwendungsgebiet dieses Keimzählprinzips. Für die praktische Durchführung bedeutet die Computer-Bildanalyse wegen der Sicherheit und Schnelligkeit der Zählung und bei bestimmten Mindestprobenzahlen auch aus ökonomischen Gründen wesentliche Vorteile gegenüber der konventionellen visuellen Auszählung der gewachsenen Kolonien.

Schlußfolgernd können aus den vorliegenden Untersuchungen folgende Empfehlungen gegeben werden:

1. Der aktuelle bakteriell-katabole Status der Rohmilch kann durch eine einmalige Pyruvatbestimmung hinreichend sicher erfaßt werden. Wenn jedoch in Keimzahlbereichen unterhalb 1 Million/ml Milch eine differenzierte bakteriologische Betrachtung von Interesse ist, kann auf relativ aufwendige Koloniezählverfahren wie die elektronische Mikrokoloniezählung bzw. die Computer-Bildanalyse von Plattenkulturen nicht verzichtet werden.
2. Die potentielle Gefährdung des Substrates bzw. das Verderbnisrisiko oder die Haltbarkeit im Rohmilchbereich dürften durch eine zweimalige Pyruvatbestimmung vor und nach einer Inkubation gut zu charakterisieren sein (Delta-Wert).

3. In der pasteurisierten Trinkmilch zeigt Pyruvat unmittelbar nach der Erhitzung die mikrobiologische Belastung aus dem Rohmilchbereich an. Die thermophile und rekontaminierende Flora muß durch Plattenverfahren erfaßt werden. Für die Bestimmung der Haltbarkeit gilt das für die Rohmilch unter 2. beschriebene entsprechend.

Die Aussagekraft und Praktikabilität der Pyruvat-Messung zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit der Milch bedürfen jedoch noch umfassender Untersuchungen, in denen alle Bedingungen der milchwirtschaftlichen Praxis - insbesondere die in den verschiedenen Einzugsgebieten unterschiedlich gehandhabte Stapelung und Anlieferung der Rohmilch - Berücksichtigung finden müssen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In Fortführung der experimentellen Arbeiten des Instituts für Hygiene der Bundesanstalt für Milchwissenschaft in Kiel über die Messung und Beurteilung des bakteriellen Katabolismus in Milch wurde mir die Aufgabe gestellt,

1. die Eignung der Brenztraubensäure als zentralem Stoffwechselparameter zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit der Milch

und

2. die Möglichkeit einer Automatisierung von Keimzählungen durch den Einsatz der Computer-Bild-Analyse.

zu prüfen.

Die hierzu vorgenommenen experimentellen Untersuchungen haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

- ad 1. Pyruvat ist in der kontinuierlichen Durchflußanalyse mit hoher Sicherheit und in einer Frequenz von 80 - 120 Proben pro Stunde weitgehend bedienungsneutral nachzuweisen. Seine enzymatische Bestimmung mit LDH ist so spezifisch, daß andere Einflußgrößen wie β -Hydroxy-Pyruvat, Glyoxalat, α -Keto-Butyrat, α -Keto-n-valerat und Oxalacetat für den vorgesehenen Zweck vernachlässigt werden können. Der Pyruvat-Pool kann für mindestens 2 Tage bei 20°C mit der gleichen Formalin-Konzentration konserviert werden, wie sie für die Fixierung somatischer Zellen zur Zählung im elektronischen Partikelzähler oder in der kontinuierlichen Durchflußanalyse verwendet wird. In steril gewonnener Rohmilch gesunder Versuchstiere sowie in 2 041 Viertelgemelksproben aus einem Praxisbezirk liegt der Pyruvat-Pool unter 3 ppm und ist unabhängig von laktationsphysiologischen Einflüssen wie Viertelposition, Laktationsnummer und -stadium. Die Anzahl somatischer Zellen ist nur bei pathologisch erhöhten Werten (> 3 Millionen/ml) mit einem Anstieg des Pyruvat-Pools über 3 ppm verbunden, wahrscheinlich als Folge kataboler Reaktionen der Mastitiserreger. Turbulente Luftdurch-

mischungen, wie sie bei Gewinnung, Transport und Bearbeitung der Milch auftreten können, beeinflussen nicht die Pyruvatwerte.

Dagegen haben sequentielle Pyruvatbestimmungen an steril gewonnener Rohmilch, 320 Proben roher Sammelmilch und 378 Proben pasteurisierter Trinkmilch ergeben, daß der Pyruvat-Pool ausschließlich von der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen abhängig ist. Die Substanz charakterisiert vorwiegend milchhygienisch unerwünschte proteo- und lipolytische Prozesse und verhält sich somit gegenläufig zur Aussage der Reduktionsproben. In einmaligen Stichproben von 1 709 rohen Sammelmilchen variierten die Pyruvatwerte zwischen 0,5 ppm und 30 ppm. Ein Anstieg über den als Grenzwert der Norm angesehenen Bereich von 3 ppm ist mit Keimzahlen von ca. 1 Million/ml verbunden.

Von besonderem praktischem Interesse dürfte es sein, daß Pyruvat unverändert die Pasteurisierung überdauert und somit erstmals die Möglichkeit gegeben ist, ein sich insgesamt addierendes, lückenloses Bild der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit der Milch von der Gewinnung bis zum Konsum aufzuzeichnen.

ad 2. Die Computer-Bild-Analyse von Plattenkulturen zur Erfassung der Gesamtkeimzahl auf Hefeextrakt-Trypton-Glukose-Agar und verschiedener Keimgruppen über Selektiv-Nährmedien ermöglicht eine sichere und rationelle Erfassung des bakteriologisch-hygienischen Status der Milch auch in solchen Keimzahlbereichen, die noch keinen systematischen Anstieg des Pyruvat-Pools bewirken.

Insgesamt ergibt sich aus den vorliegenden Untersuchungen, daß der aktuelle bakteriell-katabole Status der Rohmilch insbesondere unter psychrotrophen Bedingungen über eine einmalige Pyruvatbestimmung hinreichend sicher erfaßt werden kann. Die potentielle Gefährdung von roher oder pasteurisierter Milch, d. h. das Verderbnisrisiko bzw. die Haltbarkeit, dürfte durch eine zweimalige Pyruvatbestimmung vor und nach einer Inkubation

gut zu charakterisieren sein. Unterhalb der durch Pyruvat angezeigten Veränderungen (< 3 ppm) müssen bakteriologisch-kulturelle Verfahren herangezogen werden, deren praktische Durchführung durch die Computer-Bildanalyse wesentlich erleichtert werden kann.

Die Aussagekraft der Pyruvat-Bestimmung bedarf weiterer Untersuchungen, die insbesondere die verschiedenen Bedingungen der Aufbewahrung und Anlieferung von Rohmilch berücksichtigen sollten.

6. LITERATUR

1. TOLLE, A., HEESCHEN, W.,
REICHMUTH, J. und KIND, H. (1971): Trinkmilch in der Bundesrepublik Deutschland: Eine Untersuchung zum bakteriologischen, biochemischen und rückstandsanalytischen Status Kieler Milchw. Forsch. Ber. Heft 4, 23,
2. RIEMANN, H. (1969): Food Borne Infections and Intoxications Academic Press, New York/London
3. HOBBS, B. C. (1968): Food Poisoning and Food Hygiene Edward Arnold LTD, London
4. COCKBURN, W. CH. (1962): Food Poisoning The Royal Soc. Health, London
5. HEIDRICH, H. J., GROSSKLAUS, D. und MÜLLING, M. (1964): Vergleichende bakterielle Untersuchungen an durch Handmelken und durch Venülenpunktion der Drüsenzisterne gewonnenen Milchen
I. Untersuchungen an Venülen-Milchen
II. Vergleichende Untersuchungen an Handmelk- und Venülen-Milchen Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 77, 83 und 85
6. OLSON, J. C. (1962): Hygienic aspects of milk and payment for quality J. Milk Fd Technol. 25, 355
7. RITTER, J. (1931): Diss. Tierärztl. Hochschule, Wien, zit. nach BA. für MILCHFORSCH. (22)
8. SEELEMAN, M. (1942/ 1943): Zum primären Vorkommen des Streptococcus lactis und von Enterokokken in der Milchdrüse des Rindes sowie zur Bedeutung dieser Milchsäure-Streptokokken bei Sekretionsstörungen und anderen Erkrankungen der Tiere und des Menschen Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 149, 441
9. JACQUET, J., RICHOU, R.,
STEEG, S., JULIENNE, P. und
GERBAUX, C. (1951): C.R. Acad. Sci. (Paris) 234, 255
zit. nach BA. für MILCHFORSCH. (22)

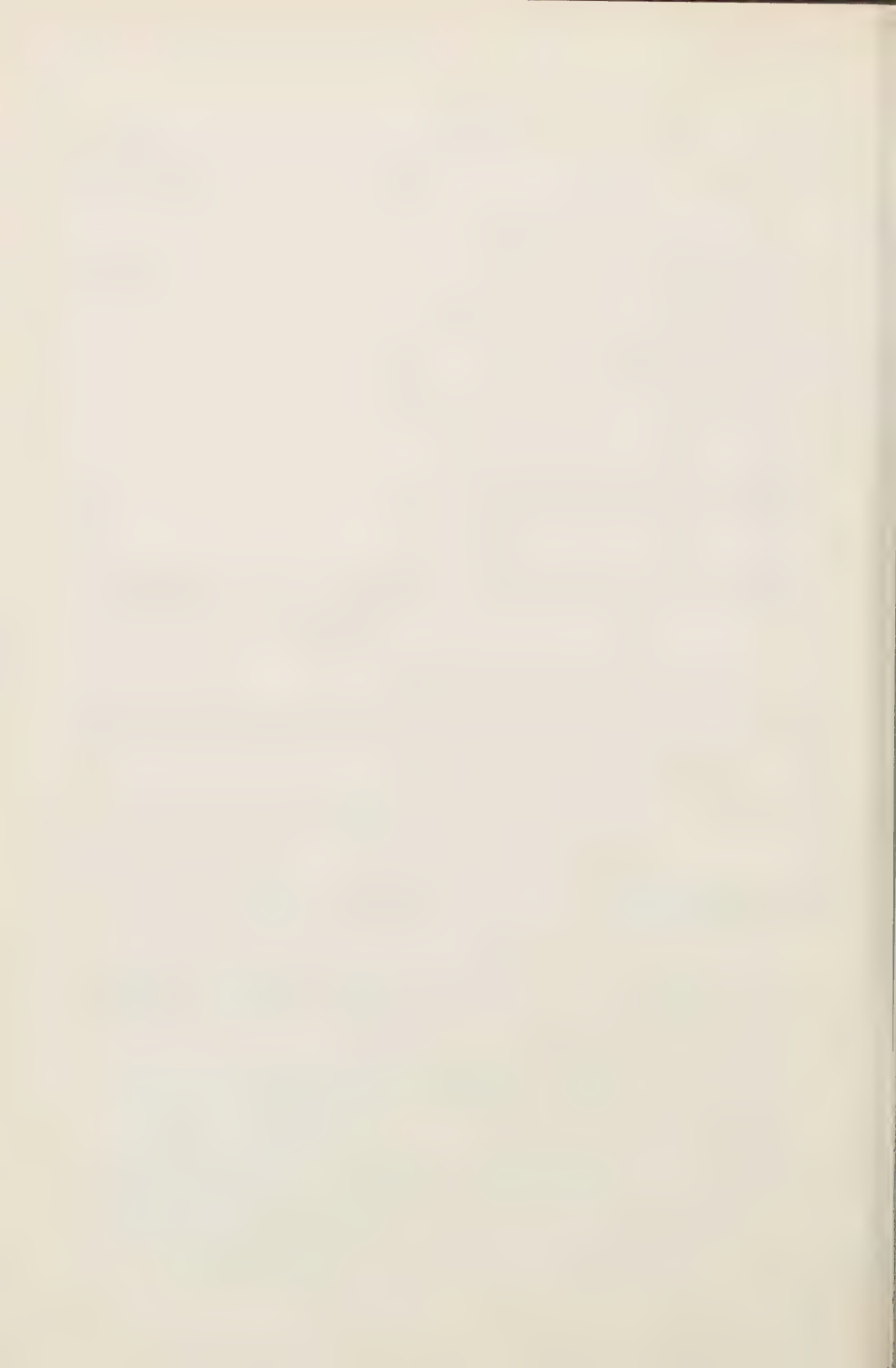
10. KANDLER, O. (1964): III. Mitt.: Überlegungen zur Auswahl der bakteriologischen Prüfmethode und zum Ausbau der Qualitätskontrolle Dtsch. Molkerei-Ztg 85, 352
11. KÄSTLI, P. (1964): Milchkunde, Verbandsdruckerei AG., Bern
12. ABO-ELNAGA, J. G. und KANDLER, O. (1965): Zur Kenntnis der Milchflora der Melkmaschine Milchwissenschaft 20, 660
13. KARLSSON, P. (1967): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler Georg Thieme Verlag, Stuttgart
14. WORSTORFF, H. (1971): Persönliche Mitteilung
15. SOLTERBECK, H. W. (1966): Die Situation und die Erfordernisse bei der Gütebewertung der Anlieferungsmilch Molk. -und Käs. Ztg 17, 1194
16. LERCHE, M. (1966): Lehrbuch der tierärztlichen Milchüberwachung Paul Parey Verlag
17. HEESCHEN, W. (1971): Untersuchungen zur quantitativen Analyse und lebensmittelhygienischen Bedeutung bakterieller kataboler Reaktionen in Milch Vet. med. Habil. Schrift, Berlin-imDruck
18. LEMBKE, A., KAUFMANN, A. und LAGONI, H. (1952): Fermentative Studien an Mikroorganismen Kieler Milchw. Forsch. Ber. 4, 361
19. BLAU, G. (1960): Zur Keimzahlbestimmung der Anlieferungsmilch Milchwissenschaft 15, 178
20. TOLLE, A., HEESCHEN, W. und ZEIDLER, H. (1966): Zur Beurteilung der hygienischen Qualität der Anlieferungsmilch mit Hilfe neuer Methoden Milchwissenschaft 21, 757
21. TEWES, G. (1952): Über Mängel der Reduktaseproben für die Qualitätsbezahlung der Milch Dtsch. Molkerei-Ztg 73, 1457

22. BUNDESANSTALT FÜR MILCH- (1969): Die hygienische Wertigkeit der
FORSCHUNG, KIEL Rohmilch und Empfehlungen zu
ihrer Verbesserung
Kieler Milchw. Forsch. Ber., Heft 3, 21
23. DEMETER, K.-J. (1967): Bakteriologische Untersuchungs-
methoden der Milchwissenschaft
Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
24. SCHULZ, M.E. und VOSS, E. (1965): Das große Molkerei-Lexikon
Volkswirtschaftlicher Verlag GmbH.,
Kempten/Allgäu, 349
25. CACIULARU, A. und (1962): Contribution à l'étude de la qualité
SCORTESCO, G. microbiologique du lait appréciée
par l'épreuve de la réductase
XVI. Intern. Milchwirtschaftskongreß
C 410
26. ROEDER, G. (1954): Grundzüge der Milchwirtschaft
und des Molkereiwesens
Paul Parey Verlag
27. FUCHS, H. J. (1951): zit. in HINSBERG-LANG:
Medizinische Chemie
Verlag Urban u. Schwarzenberg,
München/Berlin
28. DAVIDSON, J. (1949): The colorimetric determination of
lactic acid in milk and milkproducts
J. Dairy Res. 16, 209
29. STEINSHOLT, K. und (1960): A rapid colorimetric method for the
CALBERT, H.E. determination of lactic acid in milk
and milkproducts
30. KIERMEIER, F. (1968): Handbuch der Lebensmittelchemie,
Band III/1
Springer Verlag, Berlin
31. LANGENDORF, H. (1969): Ammoniak als Lebensmittelbestandteil
und als Metabolit
Z. ErnährWiss. 9, 301
32. COULTER, W.H. (1953): U.S. Patent 2656508
33. HALL, C.W. und TROUT, G.M. (1968): Milk Pasteurization
AVJ, Westport, Connecticut

34. STORGARDS, T. (1962): Bacteria which survive pasteurization and her importance in K-milk
Mejeritidskr. Finl. Svensk 19, 132
35. THOMAS, S. B. (1966): Herkunft, Vorkommen und Bedeutung psychrophiler Bakterien in Milch
Milchwissenschaft 21, 270
36. GALESLOOT, T. E. und LABOTS, H. (1959): Thermophilic bacilli in milk with special reference to the making of sterilized milk and chocolate milk
Ned. Melk en Zuiveltijdschr. 13, 155
37. GLENN, W. E. und OLSON, H. C. (1959): Sources heat resistance and growth at refrigeration temperatures of coliforms in pasteurized milk
Milk Dk. 48, 54
38. HERMIER, J. und BERGERE, J. L. (1959): Origine des spores de thermophiles et conditions de leur destruction dans la préparation du lait "sterilise" commercial
XV. Internat. Milchwirtschafts-Kongreß 1, 435
39. CANNON, R. Y. (1970): Types and populations of micro-organisms in the air of fluid milk plants
J. Milk Fd Technol. 33, 19
40. TERPLAN, G. (1968): Zur hygienischen Beschaffenheit der Trinkmilch
Molk.-und Käs. Ztg 19, 646
41. HELLMANN, E. (1969): Ergebnisse der Differenzierung von Enterobacteriaceen aus Milch
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 241
42. GALESLOOT, T. E. und LABOTS, H. (1959): Über die Bakteriologie von sterilisierter Milch und Milchprodukten
Ned. Melk en Zuiveltijdschr. 13, 16
43. RITTER, P. (1966): Standard for the count of coliform bacteria in raw and pasteurized milk (routine method) IDF-Doc VI - 36
44. DEUTSCHE KOMMISSION ZUR VEREINHEITLICHUNG DER UNTERSUCHUNGSMETHODEN FÜR MILCH UND MILCHPRODUKTE (1960): Milchwissenschaft 15, 120

45. OBERZILL, W. (1967): Mikrobiologische Analytik
Hans Carl Verlag, Nürnberg
46. LEMBKE, A. und WASSERFALL, F. (1963): Zur Kritik des KOCH' schen Platten-
verfahrens mittels der Varianzanalyse
Kieler Milchw. Forsch. Ber. 15
47. WASSERFALL, F. (1967): Die optischen und kulturellen
Methoden zur Bestimmung der
Keimzahlen in Milch
Dtsch. Molkerei-Ztg 21, 1513
48. WILSON, S. G. (1935): The bacteriological grading of milk
H. M. State Office, London
49. BERGMAYER, H. U. (1970): Methoden der enzymatischen Analyse,
Band II
Verlag Chemie, Weinheim
50. BOEHRINGER (1969): Enzymatische Analyse für die Lebens-
mittelchemie - Pyruvat
Biochemica, Mannheim
51. BOEHRINGER (1971): Theorie des enzymatischen Tests
Biochemica, Mannheim
52. FORICHON, J., MINAIRE, Y.
und STUDIEVIC, C. (1966): Dosage Fluorométric Enzymatique
de l' Acide par l' Auto-Analyzer
Technicon Symposium Ardsley,
New York
53. METALS RESEARCH (1970/ Technische Information
1971):
54. SKEGGS, L. T. (1957): An automatic method for colorimetric
analysis
Am. J. clin. Path. 28, 311
55. SCHULZ, W. (1966): Automatische Bestimmung von Stick-
stoff in Milchprodukten und Milch mit
dem kontinuierlichen Technicon-
Digester
Technicon Symposium, Paris
56. BRET, M. (1964): Die Verwendung des Auto-Analyzers
in der Käseindustrie
Technicon Symposium, Frankfurt

57. BRISSON, G. J. (1966): Determination of total nitrogen in milk using a Technicon Auto-Analyzer System
Technicon Symposium, Paris
58. HOCELLA, N. J. und WEINHOUSE, S. (1964): Automation in der analytischen Chemie
Technicon Symposium, Sonderdruck 327
59. CLEMENTS, J. A. (1969): Persönliche Mitteilung
zit. nach HEESCHEN, W. (17)
60. FAULKNER, D. E. (1937): J. biol. Chem. 120, 51
zit. nach CLEMENTS, J. A. (59)
61. BBL (BALTIMORE BIOLOGICAL LABORATORIES)
USA
62. HEESCHEN, W., TOLLE, A. und ZEIDLER, H. (1968): Die selektive Züchtung und Anreicherung koagulasepositiver Staphylokokken und euterpathogener Streptokokken in flüssigen Nährmedien
Arch. Lebensmittelhyg. 19, 184
63. KIELWEIN, G. (1969): Ein Nährboden zur selektiven Züchtung von Pseudomonaden und Aeromonaden
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 131
64. TOLLE, A. (1965): Vortrag zur 9. Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen
65. TOLLE, A., ZEIDLER, H. und HEESCHEN, W. (1966): Ein Verfahren zur elektronischen Zählung von Milchzellen
Milchwissenschaft 21, 93
66. ZEIDLER, H., TOLLE, A. und HEESCHEN, W. (1968): Verbesserte Präparationstechnik zur elektronischen Bestimmung des Zellgehaltes in Milch
Milchwissenschaft 23, 564
67. TOLLE, A., ZEIDLER, H. HEESCHEN, W. und REICHMUTH, J. (1971): Counting of somatic cells in milk and possibilities of automation
Dairy Sci. Abstr. - im Druck
68. REICHMUTH, J. (1968): Zum Einfluß subklinisch verlaufender Sekretionsstörungen und Mastitiden auf die Milchleistung von Kühen der Rasse "Deutsche Schwarzbunte"
Vet. med. Diss., Berlin



Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Tolle
für die hervorragenden Möglichkeiten zur Durchführung
dieser Arbeit.



LEBENS LAUF

Am 8. September 1945 wurde ich, Helmut Wernery, als 11. von 12 Kindern des Tierarztes Dr. Hugo Wernery und seiner Ehefrau Fenna geb. Stahr in Leck/Nordfriesland geboren und besitze seitdem die deutsche Staatsangehörigkeit. In meinem Heimatort wurde ich 1951 eingeschult.

1955 zog ich mit meiner Familie nach Münster/Westfalen um, wo ich die vierjährige Volksschulzeit beendete.

In den Jahren 1956 bis 1963 besuchte ich das altsprachliche Schillergymnasium in Münster. Im Herbst 1963 siedelte ich nach Frankfurt/Main über und legte dort 1965 die Reifeprüfung auf dem Lessinggymnasium ab.

Im Frühjahr 1965 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität von Berlin, an der ich 1966 bzw. 1967 die tierärztliche Vorprüfung bestand. Dort absolvierte ich auch das tierärztliche Staatsexamen und erhielt am 24. Februar 1970 die Bestallung als Tierarzt.

Nachdem ich in verschiedenen Praxen Norddeutschlands tätig gewesen war, bin ich seit dem 1. Oktober 1970 wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Hygiene der Bundesanstalt für MilCHForschung in Kiel.

